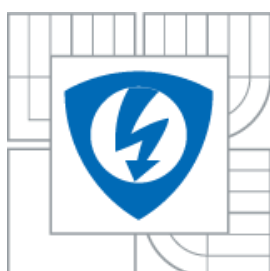




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLGIÍ**
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

APLIKACE SPEKTROFOTOMETRŮ

APPLICATION OF SPECTROPHOTOMETERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

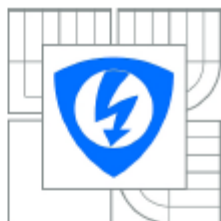
MARIE KLIMEŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. RADIM KOLÁŘ, Ph.D.

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Marie Klimešová
Ročník: 3

ID: 106144
Akademický rok: 2010/2011

NÁZEV TÉMATU:

Aplikace spektrofotometrů

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se a popište funkci spektrofotometrů, které se používají v analytické chemii ke stanovení vlastností kapalných vzorků (především absorpance a fluorescence). Dále prostudujte a popište jevy spojené se spektrometrií jako je fluorescence, fosforescence, absorpance, transmitance a jejich využití pro charakterizaci látek. Prakticky se seznámte se spektrofotometri, které jsou k dispozici v laboratořích ÚBMT, jejich ovládáním a navrhnete laboratorní úlohy pro měření koncentrace, absorpance a fluorescence kapalných vzorků. Vypracujete ukázkové protokoly pro navržené úlohy.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] WEBSTER, J.G. Medical Instrumentation: Application and Design, Wiley, 1997
[2] Spektrofotometrie. In WikiSkripta [online]. Praha : MEFANET, 2008- [cit. 2010-08-30]. Dostupné:
<<http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Spektrofotometrie&oldid=9760>>

Termín zadání: 7.2.2011

Termín odevzdání: 27.5.2011

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Práce pojednává o významné analytické metodě – spektrofotometrii. Základem je měření absorpce záření v určitém rozsahu vlnových délek. Na tomto principu lze stanovit absorbanci a transmitanci měřených vzorků. Práce dále popisuje jevy, které souvisí s excitací molekul. Patří mezi ně absorpce, vibrační relaxace, vnitřní konverze, mezisystémový přechod, fluorescence, fosforescence a zpožděná fluorescence.

Praktická část zahrnuje tři experimentální měření. V prvním měření jsou zjišťovány koncentrace roztoků manganistanu draselného. V druhém experimentu se ověřuje platnost Lambert-Beerova zákona. V třetím experimentu je měřena fluorescence fluoresceinu a zjišťována závislost koncentrace fluoroforu na intenzitě fluorescence. Měření probíhá v prostředí SpectraSuite s využitím školních spektrometrů USB2000+ a USB650 Red Tide.

ABSTRACT

The work deals with the important analytical method - spectrometry. It is based on measurement of absorption of radiation in a wavelength range. On this principle can determine the absorbance and transmittance of the measured samples. The thesis also describes events related to the excitation of molecules. These include absorption, vibrational relaxation, internal conversion, inter-system crossing, fluorescence, phosphorescence and delayed fluorescence.

The practical part includes three experimental measurements. The first measurement is the concentrations of potassium permanganate solution. In a second experiment, verifying the validity of Lambert-Beer law. In the third experiment, the fluorescence measurement of fluorescein and detection of fluorophore concentration dependence on fluorescence intensity. Measurement is performed in an environment SpectraSuite with the use of school spectrometers USB2000 + and USB650 Red Tide.

KLÍČOVÁ SLOVA

Spektrofotometrie, absorbance, transmittance, fluorescence, fosforescence.

KEYWORDS

Spectrophotometry, absorbance, transmittance, fluorescence, phosphorescence.

KLIMEŠOVÁ, M. *Aplikace spektrofotometrů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 59 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Radim Kolář, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Aplikace spektrofotometrů jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestně právních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 27. května 2011

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce *doc. Ing. Radimu Kolářovi, Ph.D.* za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne 27. května 2011

.....
podpis autora

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. SPEKTROFOTOMETRIE.....	8
2.1 VELIČINY UŽÍVANÉ VE SPEKTROFOTOMETRII	10
3. PROCESY SPOJENÉ S EXCITACÍ MOLEKUL	12
3.1 ABSORPCE ENERGIE.....	12
3.2 VIBRAČNÍ RELAXACE	13
3.3 VNITŘNÍ KONVERZE.....	14
3.4 MEZISYSTÉMOVÝ SINGLET-TRIPLETOVÝ PŘECHOD	14
3.5 FLUORESCENCE	15
3.6 FOSFORESCENCE	16
3.7 ZPOŽDĚNÁ FLUORESCENCE	17
3.8 ZHÁŠENÍ LUMINISCENCE	17
3.9 EMISNÍ A EXCITAČNÍ SPEKTRUM	18
3.10 VÝTĚŽEK LUMINISCENCE.....	19
4. SPEKTROFOTOMETR	21
4.1 ZDROJ ZÁŘENÍ.....	21
4.2 MONOCHROMÁTOR.....	22
4.3 VZOREK	22
4.4 DETEKTOR.....	23
5. DRUHY SPEKTROFOTOMETRŮ	24
5.1 ABSORPČNÍ SPEKTROSKOPIE	24
5.1.1 ULTRAFIALOVO-VIDITELNÁ SPEKTROSKOPIE.....	24
5.1.2 INFRAČERVENÁ SPEKTROFOTOMETRIE.....	25
5.2 EMISNÍ SPEKTROSKOPIE	25
5.2.1 FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE.....	25
6. EXPERIMENTY	27
6.1 ABSORBANCE	27
6.2 KONCENTRACE	27
6.3 TRANSMITANCE.....	28
6.4 REFLEXE	28
6.5 INTENZITA VYZAŘOVÁNÍ	29
6.6 FLUORESCENCE	30
7. PRAKTICKÁ ČÁST	31
7.1 MĚŘENÍ KONCENTRACE ROZTOKŮ KMnO_4	31
7.2 OVĚŘENÍ PLATNOSTI LAMBERT-BEEROVA ZÁKONA	35
7.3 MĚŘENÍ FLUORESCENCE.....	38
8. ZÁVĚR	44
9. POUŽITÁ LITERATURA	45
PŘÍLOHA A: PROTOKOLY PRO NAVRŽENÉ ÚLOHY	47
PŘÍLOHA B: LABORATORNÍ SPEKTROFOTOMETRY.....	55

1. ÚVOD

Práce pojednává o spektrofotometrech, které jsou používány nejen v analytické chemii, ale mají své uplatnění i v biofyzice a dalších vědních oborech. Spektrofotometry slouží ke stanovení vlastností vzorků, především koncentrace a jsou používány pro svou snadnost měření a přesnost.

Spektrofotometrie je optická analytická metoda využívající jevů vznikajících při interakci hmoty a elektromagnetického záření. Stanovení vlastností látek se děje na základě pohlcování záření. Množství světla, které látka pohltí (absorbuje), závisí na absorbanci. Absorbance je podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci látky.

Při absorpci záření dochází k excitaci molekul. Mezi absorpční spektrofotometry patří ultrafialovo-viditelné spektrofotometry a infračervené spektrofotometry.

Po navrácení částice na základní hladinu dochází k emisi (vyzáření) energie. Ve viditelné oblasti se emise projeví fluorescencí a fosforescencí. Tyto jevy umožňuje měřit fluorescenční spektrofotometr. O fluorescenční metody se v posledních letech zvýšil zájem. Jsou široce využívány v biotechnologiích, lékařství, genetice, soudním znalectví a dalších oborech.

Laboratorními spektrometry, které jsou k dispozici v laboratořích ÚBMI, může být měřena absorbance, transmittance, koncentrace, reflexe, intenzita vyzařování a fluorescence.

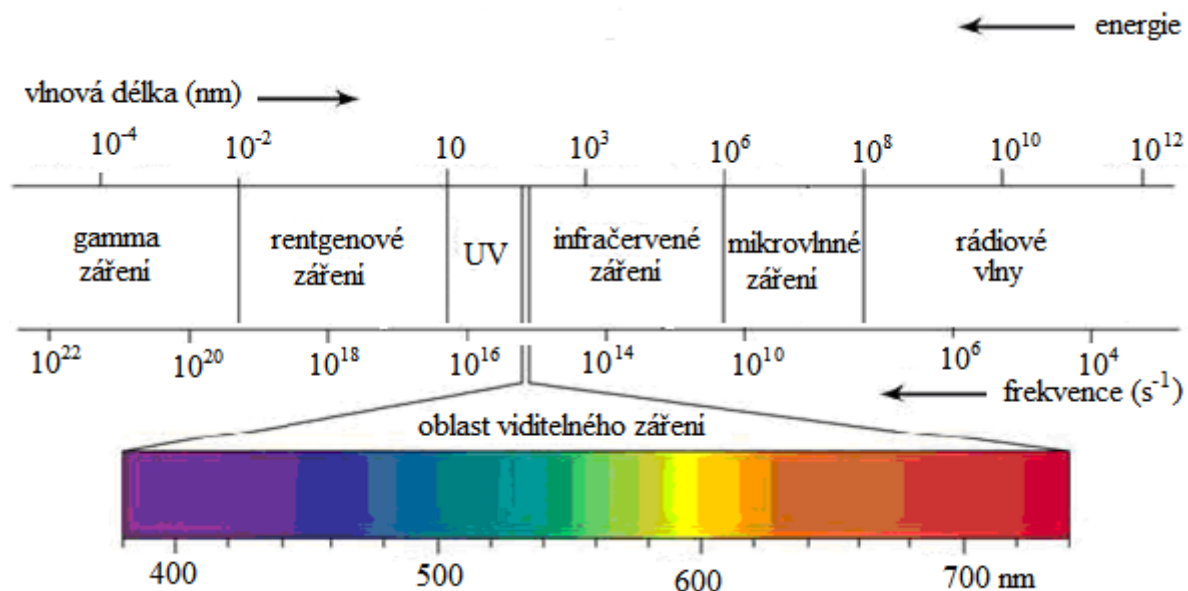
V praktické části jsou uvedeny ukázky laboratorních úloh pro měření koncentrace, absorbance a fluorescence kapalných vzorků. Byly navrženy úlohy měření koncentrace manganistanu draselného, ověření platnosti Lambert-Beerova zákona a měření fluorescence za použití fluoresceinu. Nutností bylo seznámit se s přístroji a počítačovým programem, ve kterém probíhalo měření a zpracování dat. V praktické části jsou zpracovány výsledky měření a jejich diskuze.

V příloze A jsou ukázky vypracovaných protokolů pro navržené úkoly. V protokolech je uveden postup měření a podrobný návod k obsluze programu SpectraSuite. V příloze B je uvedena charakteristika použitých laboratorních spektrofotometrů USB2000+ a USB 650 Red Tide.

2. SPEKTROFOTOMETRIE

Spektrofotometrie je základem pro řadu přístrojů používaných v klinické biochemii. Je používána pro svou snadnost měření, přesnost a možnost použít této techniky u automatických přístrojů.

Spektrofotometrie je založena na skutečnosti, že mnoho látek pohlcuje elektromagnetické záření ve viditelné části spektra, ultrafialové a v oblasti blízké infračervenému záření.[1]



Obr. 2.1 Elektromagnetické spektrum. [22]

Optické analytické metody využívají jevy vznikající při interakci hmoty a elektromagnetického záření. Interagující hmotou mohou být atomy, molekuly, ionty, radikály, případně jiné částice. [2]

Míra, jakou látka pohlcuje světlo různých vlnových délek (tj. absorpční spektrum) závisí na struktuře sloučeniny. Množství světla určité vlnové délky, které pohltí např. látka rozpuštěná v roztoku, závisí na koncentraci látky. Měření absorpce světla vzorkem patří mezi nejpoužívanější techniky v biochemii a označuje se jako fotometrie (pokud se měří při jedné nebo několika konkrétních vlnových délkách) a spektrofotometrie (pokud se měří v určitém souvislém rozsahu vlnových délek světla). [1]

Při dopadu bílého světla na vzorek může být záření zcela odraženo, pak látku vidíme jako bílou, nebo záření může zcela pohlceno, pak látku vidíme jako černou. Pokud vzorek část záření pohltí a část odrazí, barva látky viditelná pro lidské oko bude odpovídat barvě odraženého záření (tzv. doplňková barva). Viz tabulka Tab. 5.1. [1, 24]

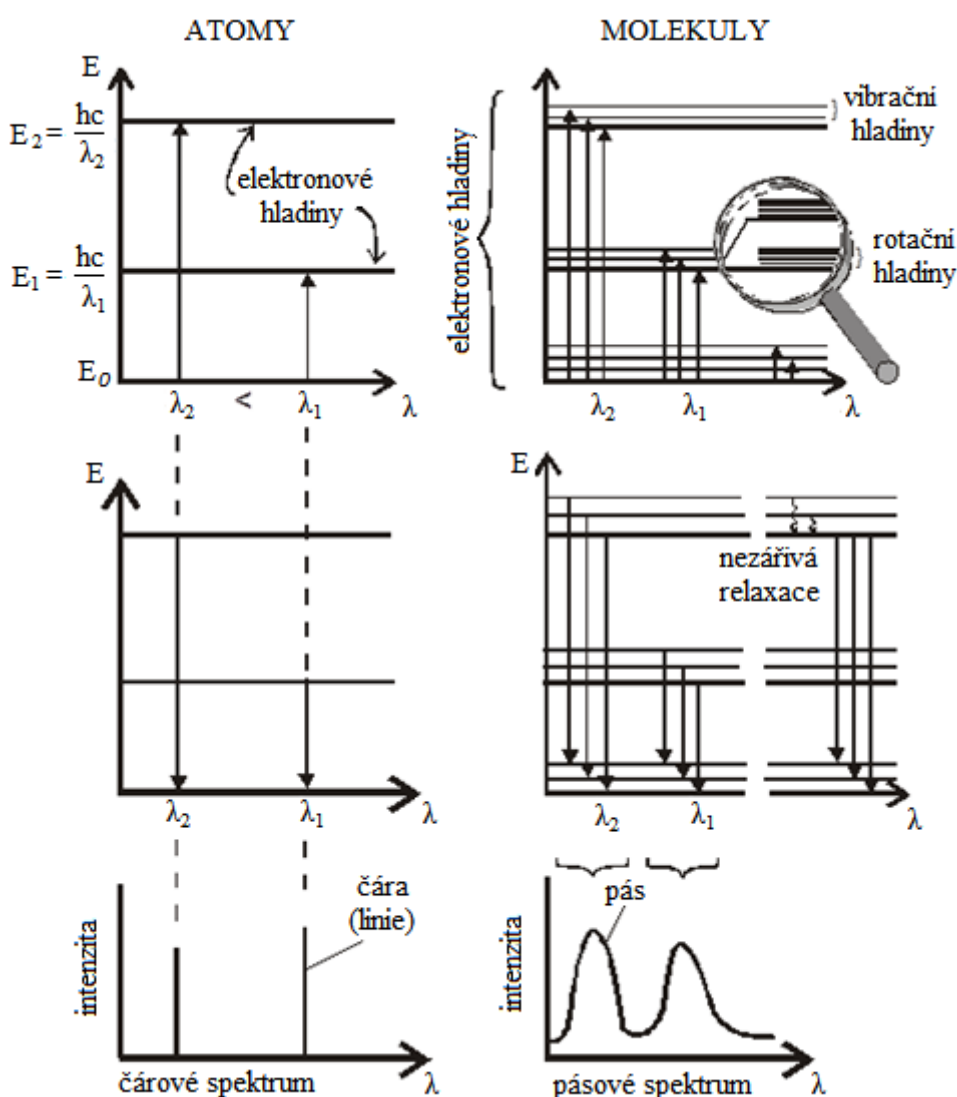
Absorpce (pohlcení) i *emise* (vyzáření) elektromagnetického záření hmotou je spojena se změnou energetického stavu. Atomům, molekulám a iontům přísluší řada odlišných kvantových stavů (spinové stavy jader a elektronů, rotační, vibrační a elektronové stavy) a jim odpovídajících energetických hladin. Při absorpci elektromagnetického záření se pohlcená energie využije k převedení atomu či molekuly do stavu energeticky bohatšího. Naopak částice tepelně či jinak excitovaná může při přechodu do stavu s nižší energií uvolněnou energii vyžářit. Atomy a molekuly existují převážně v diskrétních energetických stavech. Molekuly tedy mohou přijímat nebo vydávat energii ve formě záření pouze o zcela určitých frekvencích, odpovídajících rozdílu energií mezi jednotlivými energetickými stavy. [2]

Řada látek obsahuje valenční elektron, který může být excitován z nižší energetické hladiny E_q do vyšší (excitované) energetické hladiny E_p elektromagnetickým zářením. Protože molekuly mohou existovat pouze v určitých energetických stavech, absorbují elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Taková látka pak absorbuje záření o vlnové délce odpovídající rozdílu energií obou elektronových hladin. Rozdíl energií mezi energetickými hladinami E_p a E_q odpovídá *Planckově podmínce*:

$$\Delta E = E_p - E_q = h\nu = \frac{hc}{\lambda}, \quad (2.1)$$

kde c je rychlost světla, λ vlnová délka, h je Planckova konstanta a ν frekvence. [3]

Atomy a molekuly mohou měnit svůj energetický stav přijutím nebo vyzářením pouze určitých diskrétních hodnot energie. V *atomech* přijímají nebo vyzářují energii pouze elektrony, v *molekulách* jsou elektronové energetické hladiny rozštěpeny na podhladiny vibrační a rotační. Pro energetické rozdíly mezi hladinami platí: $\Delta E_{\text{rot}} \ll \Delta E_{\text{vibr}} \ll \Delta E_{\text{el}}$ [4]



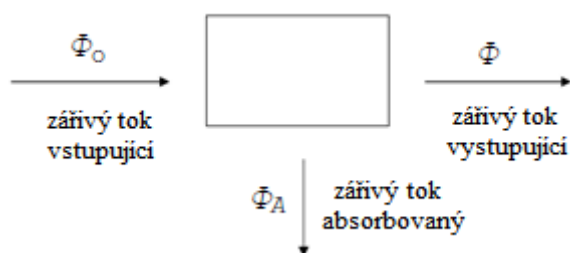
Obr. 2.2 Povaha výměny energie. [4]

Spektrum je soubor frekvencí (vlnových délek) záření, který vzorek vyzáří (emisní spektrum), resp. zachytí (absorpční spektrum). U atomů se vždy jedná o omezený počet absorbovaných či emitovaných frekvencí a výsledné spektrum označujeme jako *čárové*. Molekuly sloučenin,

které mohou být ve velmi početných energetických stavech, mají spektra *pásová* (spojitá). Viz kapitola 3. [2]

2.1 VELIČINY UŽÍVANÉ VE SPEKTROFOTOMETRII

Při absorpčním měření je ze vstupujícího toku záření¹ Φ_0 část absorbována vzorkem (absorbovaný zářivý tok Φ_A) a v ideálním případě zbytek projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ . [3]



Obr. 2.3 Schéma absorpce záření.

Podíl zářivých toků Φ / Φ_0 se nazývá propustnost nebo *transmittance* T . Transmittance se často uvádí v procentech prošlého záření.

$$T_\lambda = \left(\frac{\Phi}{\Phi_0} \right)_\lambda = e^{-k_\lambda l}, \quad (\text{Lambertův zákon}) \quad (2.2)$$

kde k_λ je koeficient absorpce, který závisí na vlastnostech látky, kterou světlo prochází. Absorpce světla v čirém roztoku je závislá na počtu absorbujících molekul. Tento počet molekul je závislý na koncentraci c_m . Koeficient absorpce k_λ je úměrný koncentraci c_m :

$$k_\lambda = \chi_\lambda c_m, \quad (2.3)$$

kde χ_λ je konstanta nezávislá na koncentraci roztoku (měrná absorpce).

Na většině spektrofotometrů lze odečíst hodnotu *absorbance* A , tj. záporně vzatý logaritmus transmittance.

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = \log \frac{1}{T} = -\log T \quad (2.4)$$

Obdobně lze psát stejnou rovnici pro veličinu intenzita světla² I :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.5)$$

Lambertův-Beerův zákon:

$$A_\lambda = -\log T_\lambda = -\frac{1}{2,303} \ln T_\lambda = \frac{\chi_\lambda}{2,303} c_m l = \varepsilon_\lambda c l, \quad (2.6)$$

¹ Zářivý tok je definován zářivou energií, kterou zdroj vyzáří za časovou jednotku. Jednotkou je watt. Z celkové zářivé energie elektromagnetického záření je člověk schopen zachytit zrakem pouze určitou část spektra, která přísluší viditelnému záření, tzn. světlu. Tato část se označuje jako světelná energie. Světelný tok je definován světelnou energií, kterou zdroj vyzáří za časovou jednotku. Jednotkou je lumen.

² Intenzita záření je definována zářivým tokem, který prochází plochou kolmou ke směru šíření záření. Jednotkou je W/m^2 .

Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky v roztoku c , tloušťce vrstvy absorbujícího roztoku l , molárnímu lineárnímu absorpčnímu koeficientu ε_λ pro danou absorbující látku a vlnovou délku použitého záření. Index λ značí, že je měřeno při určité vlnové délce. [3, 5]

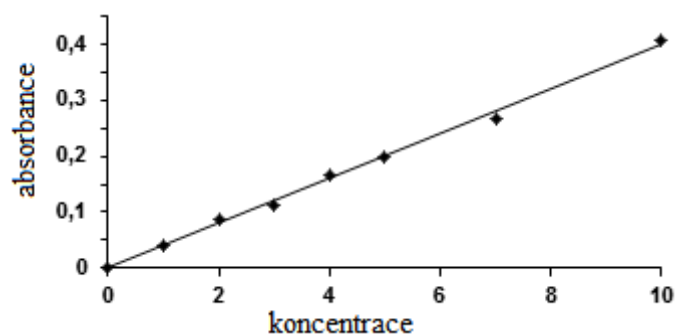
Lambert - Beerův zákon platí pouze za následujících podmínek:

- záření musí být monochromatické
- roztoky musejí být velmi zředěné ($c < 10^{-2}$ mol/l)
- absorbující prostředí nesmí podléhat žádným změnám
- v roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Pokud je v roztoku přítomno více složek, je absorbance soumou absorpčních jednotlivých složek. [13]

Zákona se v praxi využívá pro stanovení koncentrace. *Metoda standardního vzorku* - vedle vzorku o neznámé koncentraci c_2 se zpracuje i vzorek standardní c_1 o známé koncentraci. Koncentrace standardu je volena tak, aby byla ve středu kalibrační přímky. Koncentrace neznámého vzorku se vypočte z absorpčních obou vzorků a známé koncentrace:

$$\frac{A_{\lambda_1}}{A_{\lambda_2}} = \frac{c_1}{c_2} \quad (2.7)$$

Pracuje se *metodou kalibrační přímky*. Kalibrační závislost (absorbance na koncentraci) se určí měřením roztoků o známé koncentraci (standardů).

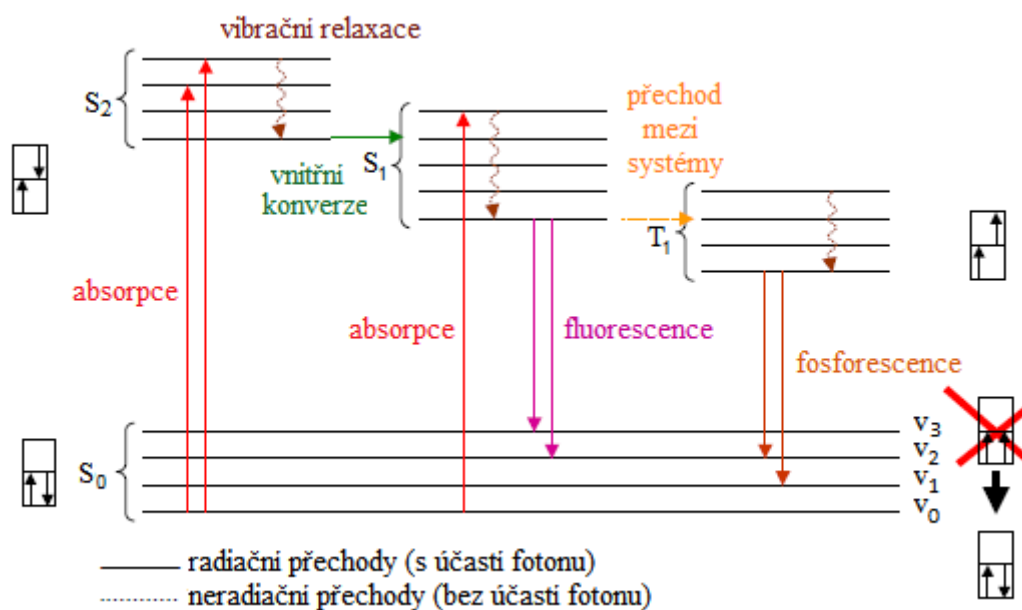


Obr. 2.4 Kalibrační graf.[2]

Jsou změřeny absorbance několika vzorků o vhodně volených odstupňovaných koncentracích (standardní vzorky). Závislost má být lineární, proto se body prokládají přímkou, která prochází počátkem. Stejným způsobem jako standardní vzorky se zpracuje vzorek o neznámé koncentraci a změří jeho absorbance. Z kalibrační přímky se odečte na ose x jeho koncentrace. [2,5]

3. PROCESY SPOJENÉ S EXCITACÍ MOLEKUL

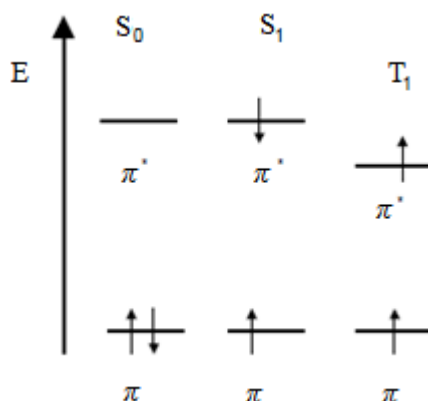
Následující text popisuje procesy, které jsou spojené s excitací molekul. Obr. 3.1 znázorňuje energie základního stavu S_0 a excitovaných singletových stavů S_1 a S_2 a tripletového stavu T_1 a přechody mezi nimi (viz následující text 3.1, kde je definován singletový s tripletový stav). Přechody jsou rozděleny na *zářivé* a *nezářivé*. Mezi nezářivé přechody patří absorpce, vibrační relaxace, vnitřní konverze a mezisystémový přechod. Mezi zářivé přechody patří fluorescence, fosforescence a zpožděná fluorescence. Vlnovkou je označena část absorbované energie, kterou molekula předá ve formě tepelné energie okolí. Zbylou energii může molekula vyzářit a přejít do základního stavu.



Obr. 3.1 Jablonského diagram.[6]

3.1 ABSORPCE ENERGIE

Absorpce je způsobena přechody vazebných (nevazebných) elektronů v molekule do antivazebných molekulových orbitalů. U složitějších molekul se jedná o kombinaci několika přechodů. Základní typy přechodů zobrazuje Obr. 3.2.



Obr. 3.2 Různé elektronové konfigurace π – elektronového systému. S_0 je základní stav, S_1 je singletový stav, T_1 je tripletový stav. [6]

Základní stav S_0 je stav nejstabilnější konfigurace, elektrony se pohybují po určitých drahách (oblastech s maximální pravděpodobností výskytu) – orbitalech. Orbitaly představují soubor několika vibračních úrovní, které se svou energetickou hladinou poněkud liší. Při pohybu po orbitalech elektrony nevyzařují energii, jsou v tzv. stacionárním stavu. Při absorpci je energie kvanta jako celek předána jednomu elektronu, který přeskočí z orbitalu o nižší energetické hladině na orbital o vyšší energetické hladině, kde je opět ve stacionárním stavu. Rozdíl energií na těchto orbitalech je právě jedno kvantum. Jedno kvantum musí být absorbováno jen jedním elektronem a to beze zbytku. Kvantu jsou absorbována π -elektrony. Uspořádání elektronového oblaku atomu nebo molekuly určuje, která energetická kvanta je látka schopna absorbovat. Jedna molekula nemůže absorbovat více kvant najednou. Molekuly některých látek mohou absorbovat více typů kvant (kvanta s různou vlnovou délkou) a jejich absorpční spektra pak mají více vrcholů (píků). Absorpcí kvanta přejde molekula do vzbuze­ného (excitovaného) stavu, absorbované záření přestává jako takové existovat.

Singletový excitovaný stav S_1 - elektrony mají opačný spin³, přechod je spinově dovolený (je pravděpodobný), vysoká intenzita absorpce. Excitovaný stav je vysoce nestabilní a trvá zlomek sekundy (asi 10^{-9} s). Návrat do stavu základního (deexcitace) se může uskutečnit různými cestami současně. Absorbovaná energie může být uvolněna opět jako *zářivá* (kvanta mají nižší energii a tedy delší vlnovou délku, emise záření ve viditelné oblasti je jev zvaný fluorescence), *kinetická* (zvýší se teplota látky), použita k chemické reakci - *fotochemická* reakce (důležitá např. při syntéze chlorofylu). Absorbovaná energie může být předána jiné molekule, která se tak dostane do excitovaného stavu, zatímco první molekula se vrátí do stavu základního. U některých látek může absorpce energie vyvolat konformační změny molekuly, např. přeměnu *cis-trans*, posun dvojné vazby (fotoizomerizace), rozštěpení nebo vznik kruhu. Konformační změny dají vznik takovým formám molekuly, které jsou výrazně stálější, než je excitovaný stav, obsahují však více vnitřní energie než před absorpcí. Za určitých podmínek se může elektron z molekuly uvolnit – dojde k oxidaci molekuly. V některých systémech (např. v některých kovech) může dojít i k pohybu elektronů a vzniku elektrického proudu (fotoelektrický jev).

Tripletový stav T_1 - elektrony mají stejný spin, tzv. zakázaný přechod (méně pravděpodobný), poskytuje pásy s nižší intenzitou absorpce, energetický rozdíl je menší oproti S_1 . [6, 25]

Typy přechodů:

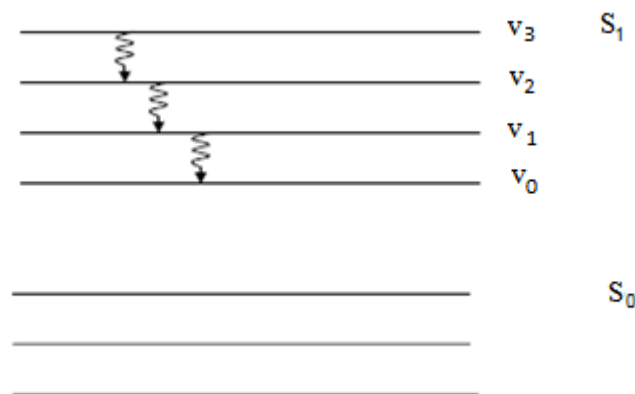
- *přechod $\sigma\text{-}\sigma^*$* jednoduché vazby (např. C-C, C-H), vyžadují velkou energii (méně než 190 nm, vakuová oblast)
- *přechod $n\text{-}\sigma^*$* nutná přítomnost atomu s volným elektronovým párem (N, S, I, Cl, Br), absorpce kolem 200 nm
- *přechod $\pi\text{-}\pi^*$* sloučeniny s dvojnými a trojnými vazbami, čím lepší konjugace vazeb, tím vyšší vlnová délka (energetická hladina nejvyššího obsazeného vazebného orbitalu se zvýší a energetická hladina nejnižšího nevazebného orbitalu se sníží → rozdíl energií je nízký), absorpce ve viditelné oblasti
- *přechod $n\text{-}\pi^*$* v molekule je kromě dvojné vazby přítomen také atom s volným elektronovým párem (N, S, Cl), nízká energie, ovlivnění $\pi\text{-}\pi^*$ přechodu

3.2 VIBRAČNÍ RELAXACE

Po excitaci na jednu z vibračních hladin v_{0-n} excitovaného stavu S_{1-n} dochází obvykle k relaxaci na nejnižší vibrační hladinu nejnižšího excitovaného stavu (molekula ve vyšším

³Spin je vlastní moment hybnosti elementární částice.

vibračním stavu snižuje svou energii přechodem na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu a přitom vyzařuje tepelnou energii). Tento proces je velice rychlý ($10^{-14} - 10^{-12}$ s). Rychlost vibračních přechodů závisí zejména na teplotě. [6, 24]



Obr. 3.3 Vibrační relaxace. [6]

3.3 VNITŘNÍ KONVERZE

Jde o přechod mezi nejnižší vibrační hladinou S_1 excitovaného stavu na nejvyšší vibrační hladinu S_0 energetického stavu (nejnižší singletová hladina). [24]

Vibrační hladiny S_0 sahají až k vibračním hladinám S_1 . Elektron tak může přejít mezi S_1 a S_0 bez toho, aby se výrazně změnila jeho energie.



Vibrační hladiny S_0 a S_1 jsou blízko sebe a za jistých okolností může elektron přejít díky tunelovému efektu⁴. Pravděpodobnost tohoto děje se zvyšuje se zmenšením vzdáleností mezi hladinami. [6]



3.4 MEZISYSTÉMOVÝ SINGLET-TRIPLETOVÝ PŘECHOD

Tripletová hladina leží níže než hladina S_1 (elektrony se stejným spinem se tolik neodpuzují jako v případě stavu S_1). Přechod z S_1 do T_1 se děje podobným mechanismem jako vnitřní konverze. Tento proces zahrnuje změnu spinu elektronu. Molekula na nejnižší vibrační hladině excitovaného stavu přechází na vysokou energetickou hladinu stavu s nižší E a jiným spinem. Mezisystémový přechod je málo pravděpodobný (tzv. spinově zakázaný přechod). Spinově povolené vibrační procesy (vibrační relaxace a vnitřní konverze) trvají přibližně 10^{-14} s, zatímco spinově zakázané procesy 10^{-8} s (srovnatelné s fluorescencí). [6, 24]

⁴ Tunelový jev je kvantový jev. V klasické fyzice není možné, aby částice s kinetickou energií menší než je výška potenciálové bariéry, s níž interaguje, tuto překážku překonala - musí se od ní odrazit. V kvantové mechanice má částice i v případě, že její energie není z klasického pohledu pro průchod bariérou postačující, jistou pravděpodobnost, že bariéru překoná - existuje tzv. tunelový efekt.

3.5 FLUORESCENCE

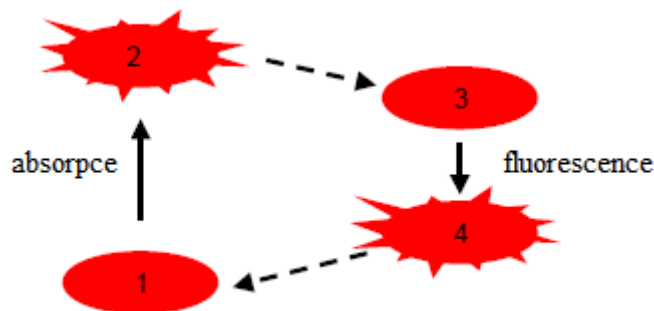
Luminiscence je emise elektromagnetického záření pevných nebo kapalných látek po excitaci. Působením jiného záření dochází k excitaci atomu, následným návratem atomu do základního stavu dochází k vyzáření fotonu. Záření o kratší vlnové délce vyvolá v látce vznik záření o delší vlnové délce, toto záření má určitou dobu doznívání. Luminiscence se dělí v závislosti na povaze excitovaného stavu do dvou kategorií – fluorescence a fosforescence.

Nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody, jedná se o *fluorescenci*. V důsledku návratu excitovaného elektronu do základního stavu je umožněna rotace spinu a rychle dochází k vyzáření fotonu (v UV-VIS oblasti). K emisi světla dochází z nejnižší vibrační hladiny S_1 na jednu z vibračních hladin S_0 . Spinově povolený přechod. Délka trvání záření fluorescence je obvykle 10^{-8} s, typická životnost⁵ fluorescence je 10 ns. Vzhledem ke krátkému trvání fluorescence vyžaduje měření emise výkonnou optiku a elektroniku. Faktory ovlivňující citlivost fluorescence jsou intezita zdroje, účinnost optického systému, štěrbiny monochromátoru, citlivost detektoru. [9]

Uplatňuje-li se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu metastabilní hladina, jedná se o *fosforescenci*. Typické pro fosforescenci je delší životnost než u fluorescence.

Franck-Condonův princip

Molekuly mají v základním a excitovaném stavu různé dipólové momenty i polarizovatelnost (je to způsobeno elektrostatickými interakcemi s okolím molekuly). Okamžitě po absorpci není excitovaná molekula v rovnovážném stavu a do rovnovážného stavu se dostane, až dojde k vyrovnání sil, které na ni působí. Doba potřebná pro molekulární relaxaci je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu. K emisi dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážného stavu. Okamžitě po vyzáření světla se molekula nachází v nerovnovážném stavu, vibrační relaxací na základní hladině se dostane do základního stavu. [6]



Obr. 3.4 Franck-Condonův princip. 1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu, 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (Franck-Condonův stav), 3 - rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu, 4 - nerovnovážná konfigurace v základním stavu (Franck-Condonův stav). [6]

Zdroje interference (chyb):

- efekt vnitřního filtru - vzdálenější vrstvy vzorku od dopadu excitačního záření jsou excitovány nižší intenzitou světla, neboť část záření je absorbována povrchovými vrstvami vzorku,

⁵ Životnost fluoroforu (látky umožňující fluorescenci) je průměrná doba mezi jeho vybuzením a navrácením do základního stavu.

- zhášení - excitovaná molekula se vrací do základního stavu nezářivým přechodem v důsledku srážky s molekulou zhášedla. Zhášedla: O₂, halogeny (Br, I).
- Ramanovy peaky- vibrační spektra pozorovaná ve viditelné a UV oblasti.

Principy fluorescenčních stanovení:

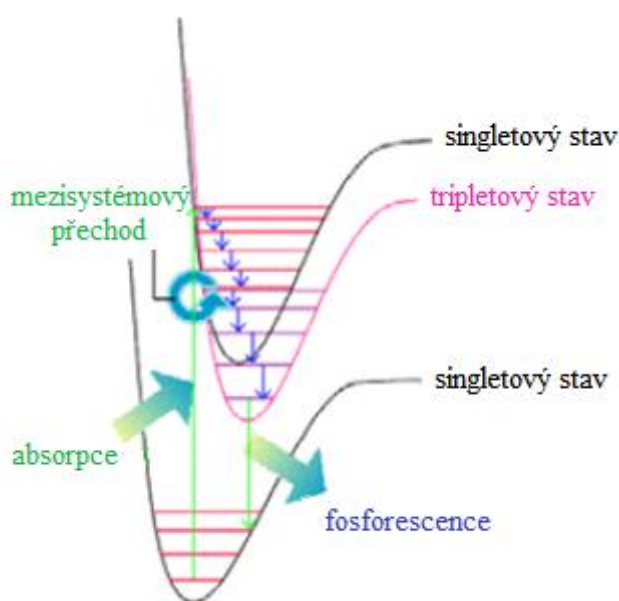
- přímé metody - měříme přirozenou fluorescenci vzorku,
- nepřímé metody - nefluoreskující vzorek přeměníme na fluoreskující derivát,
- zhášecí metody - sledujeme pokles intenzity fluorescence určitého fluoroforu, která v nastává v důsledku zhášecí schopnosti vzorku.

Mezi přirozené fluorofory patří polyaromatické uhlovodíky, vitamin A, E; karoteny, chinin, steroidy, aromatické aminokyseliny, nukleotidy, fluoreskující proteiny - GFP (green fluorescent protein). [7, 11]

3.6 FOSFORESCENCE

Příčinou dlouhého trvání fosforescence je to, že se elektrony po excitaci dostávají do takových energetických hladin, z nichž se nemohou snadno vrátit na základní hladinu, do tzv. metastabilního stavu (mezisystémový přechod). Hladina T_1 má nižší energii než hladina S_1 . Zářivý přechod z nejnižší hladiny tripletového stavu na základní stav – vyšší vlnová délka než u fluorescence. Spinově zakázaný přechod (jeho pravděpodobnost je menší), délka trvání je 10^{-3} až 10^0 s, typická životnost je obvykle několik milisekund až sekund. Delší životnost je možná, po expozici trvá emise ještě několik minut, než se excitované fosfory navrátí do základního stavu. Fosforescence není viditelná v kapalných roztocích při pokojové teplotě, protože existuje mnoho procesů, které deaktivují emisi. Je často pozorována jen za nízkých teplot a je typická pro aromatické látky. Fosforescence je méně častý jev než fluorescence. [6, 7, 9, 10]

Zdroje interference (chyb): kolizní deaktivace s molekulami solventu, zhášení, fotochemická reakce, přenos energie.

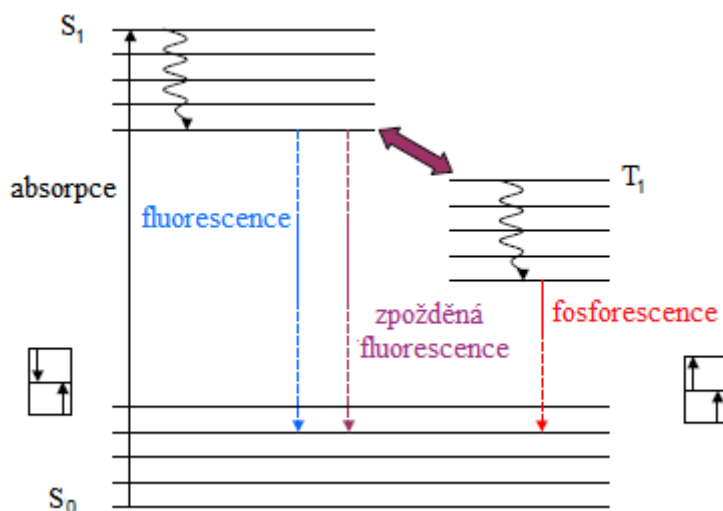


Obr. 3.5 Schéma fosforescence. [6]

3.7 ZPOŽDĚNÁ FLUORESCENCE

Čas vyhasínání tohoto procesu je srovnatelný s časem vyhasínání fosforescence. Vlnová délka emitovaného záření je stejná jako u fluorescence.

Jde o *termální excitaci* molekuly z nejnižší hladiny tripletového stavu zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu (je to reverzibilní mezisystémový přechod mezi T_1 a S_1). K fluorescenci dochází po návratu na S_1 , proto vlnová délka je stejná jako u fluorescence. Mezisystémový přechod způsobí zdržení celého děje, čas vyhasínání je mnohem delší než u fluorescence.



Obr. 3.6 Zpožděná fluorescence. [6]

E-typ zpožděné fluorescence probíhá u pevných vzorků a je doprovázen zahříváním systému, případně statistickou fluktuací elektronů mezi hladinami (jen pokud rozdíl mezi tripletovou hladinou a excitovanou singletovou hladinou není příliš vysoký). Jedná se o jednofotonovou absorpci a závislost mezi intenzitou emise a intenzitou budícího záření je lineární. Poprvé byl tento jev pozorován u eosinu, proto E-typ.

P-typ zpožděné fluorescence – k excitaci dochází po kolizi dvou molekul v tripletovém stavu. Jedna molekula v tripletovém stavu odevzdá svou energii druhé nezářivé molekule v tripletovém stavu a ta přejde do excitovaného singletu (triplet-triplet anihilation). Rozdíly mezi S_1 a T_1 mohou být vyšší než u typu E. Je to dvoufotonová absorpce (excitace dvou molekul), proto je intenzita fluorescenční emise přímo úměrná čtverci intenzity budícího záření. Poprvé byl tento jev pozorován u pyrenu, proto P-typ. [6]

3.8 ZHÁŠENÍ LUMINISCENCE

Zhášení je děj, který vede k poklesu intenzity luminiscence. Všechny možné procesy zhášení ještě nejsou zcela vysvětleny. Zhášení se dělí na dynamické a statické.

Dynamické zhášení luminiscence – k interakci mezi zhášečem a potenciálním fluoroforem dojde po excitaci, kdy excitovaná molekula vytvoří komplex s jinou částicí, vytvořený komplex nefluoreskuje, ale dojde k vytvoření nových hladin a dojde k deexcitaci vnitřní konverzí. Typická je např. tvorba komplexu s kyslíkem rozpuštěným v rozpouštědle (oxidace), I^- , Cs^+ , akrylamidem, atd. Stern-Volmerova rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3.1)$$

kde F_0 je intenzita fluorescence bez zhášedla, F je intenzita fluorescence se zhášedlem, K_{SV} je Stern-Volmerova zhášecí konstanta, Q je koncentrace zhášedla.

Statické zhášení luminiscence – ke vzniku komplexu dochází v základním stavu (vytváří se nefluoreskující komplex). Typická je např. tvorba komplexu těžkým kovem (snížení fluorescence kyseliny salicylové po komplexaci Fe^{III}). [6,7]

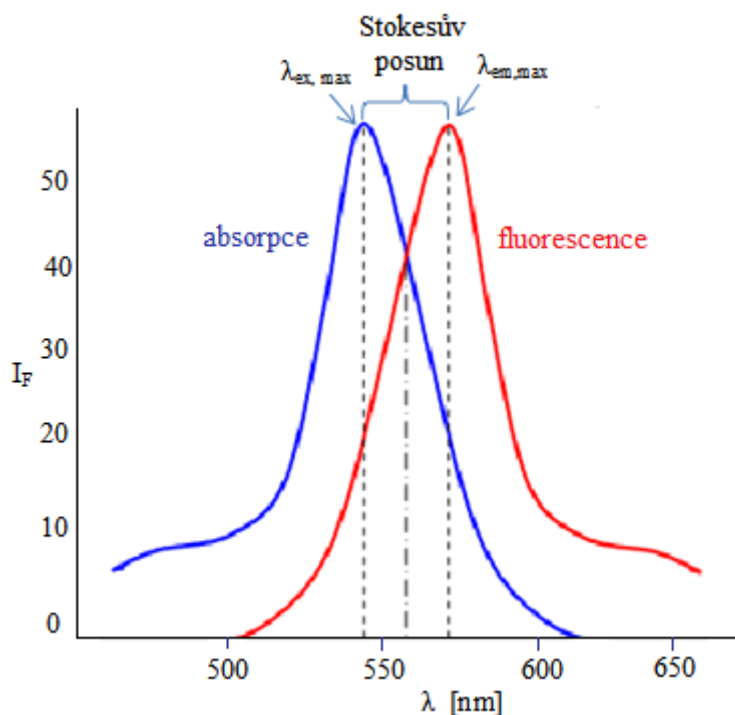
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_a[Q] \quad (3.2)$$

3.9 EMISNÍ A EXCITAČNÍ SPEKTRUM

Luminiscenci charakterizuje emisní spektrum, excitační spektrum, Stokesův posun, kvantový výtěžek, čas vyhasínání luminiscence. [7]

Emisní spektrum (fluorescenční resp. fosforescenční) – intenzita luminiscence je závislá na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{ex} .

Excitační spektrum (absorpční) – absorpce luminoforu je závislá na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{em} .



Obr. 3.7 Emisní a excitační spektrum. [7]

Excitační a absorpční spektrum mají podobný tvar, jestliže absorbuje pouze ta část molekuly odpovídá také za fluorescenci. Kashovo pravidlo: tvar emisního spektra není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra. Nejvyšší intenzita luminiscence: excitace vlnovou délkou rovnou excitačnímu maximu. Fluorescenční spektra jsou posunuta k vyšším vlnovým délkám, neboť přechod z T_1 do S_0 je spojen s menším rozdílem energie, než přechod z S_1 do S_0 . Emisní a excitační spektra organických látek mají podobný tvar, ale jsou zpravidla zrcadlově obrácené.

Stokesův posuv je rozdíl vlnových délek absorpčního a emisního spektra. Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii.

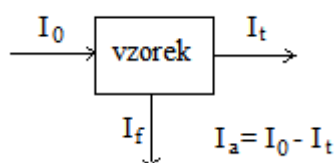
Aditivní pravidlo: fluoreskuje-li po ozáření ve vzorku více nezávislých fluoroforů, výsledná emise je součtem příspěvků emisí těchto látek. Toto pravidlo však platí pouze pro molekuly, které spolu nevyměňují energii. [6, 7]

3.10 VÝTĚŽEK LUMINISCENCE

Pro vyhodnocení intenzity luminiscence se používá kvantový výtěžek luminiscence a energetický výtěžek luminiscence.

Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek fluorescence je poměr počtu fotonů emitovaných I_f a počtu fotonů absorbovaných I_a :



$$\varphi_f = \frac{\text{intenzita fluorescence}}{\text{intenzita absorpce}} = \frac{I_f}{I_a} \quad (3.3)$$

Udává účinnost, s jakou budící fotony vyvolají luminiscenci. Jeho hodnota je vždy menší než 1 kvůli nežádoucím přechodům v excitované molekule. Pokud jsou deaktivční procesy pomalejší ve srovnání s rychlostí emisního procesu, je kvantový výtěžek luminiscence velký. Pokud jsou deaktivční procesy rychlejší, je výtěžek malý. [24]

Pro stanovení kvantových výtěžků se používá fluorescenčních standardů – látek s definovaným kvantovým výtěžkem. Molární absorpční koeficient (nebo hodnoty absorbance při stejné koncentraci) stanovené látky i standardu pro vlnovou délku excitačního záření se porovná s emisními spektry. [6]

Energetický výtěžek

Poměr množství emitované energie E_{em} a množství absorbované energie E_a se nazývá energetický výtěžek luminiscence φ_e . Slouží k hodnocení intenzity luminiscence. Za ideálních podmínek je roven jedné:

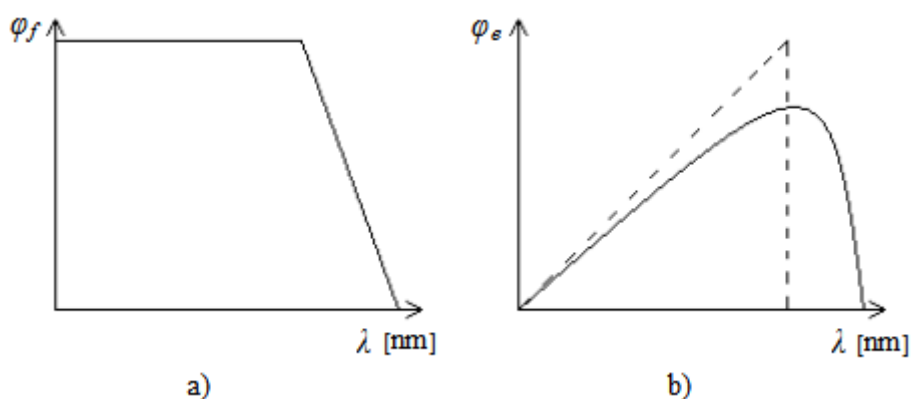
$$\varphi_e = \frac{\text{energie emise}}{\text{energie absorpce}} = \frac{E_{em}}{E_a} \quad (3.4)$$

Vztah mezi energetickým a kvantovým výtěžkem je:

$$\varphi_f = \frac{E_{em}}{E_a} = \frac{h\nu_{em}I_f}{h\nu_a I_a} = \frac{\nu_{em}}{\nu_a} \varphi_e = \frac{\frac{c}{\lambda_{em}}}{\frac{c}{\lambda_a}} \varphi_e = \frac{\lambda_a}{\lambda_{em}} \varphi_e, \quad (3.5)$$

kde h je Planckova konstanta, ν je frekvence, c je rychlost světla a λ je vlnová délka absorbovaného (emitovaného) záření.

Z uvedených vztahů vyplývá, že $\varphi_f \geq \varphi_e$. Zatímco s růstem vlnové délky roste i energetický výtěžek φ_e , kvantový výtěžek φ_f zůstává do určité mezní hodnoty na vlnové délce nezávislý. [24, 25]



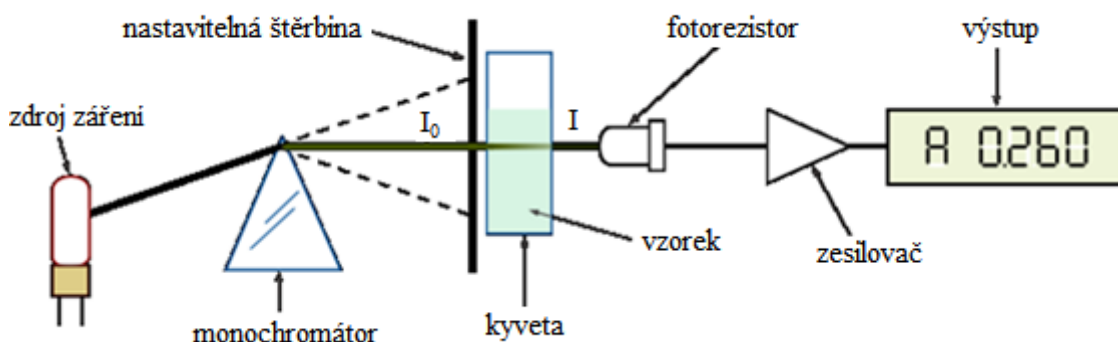
Obr. 3.8 a) Závislost kvantového výtěžku fotoluminiscence na vlnové délce excitačního záření, b) Závislost energetického výtěžku fotoluminiscence na vlnové délce excitačního záření (přerušovaně: teoretická závislost, plná čára: praktická závislost). [25]

4. SPEKTROFOTOMETR

Pro měření veličin jako absorbance a transmittance, ale někdy např. i turbidance, se používají fotometry a spektrofotometry. Zařízení, která měří při jedné nebo jen několika přesně definovaných vlnových délkách monochromatického světla, označujeme jako fotometry. Fotometry jsou jednodušší a používají k vymezení úzkého pásma vlnových délek filtry. Lze tedy měřit jen při těch vlnových délkách, které nám filtry umožňují separovat. Technicky složitější a dokonalejší přístroje, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit, nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek, se nazývají spektrofotometry. Spektrofotometry používají mřížkový monochromátor, který dovoluje kontinuálně měnit vlnovou délku měření v širokém intervalu. [1, 21]

Základní části spektrofotometru

Zdroj záření vysílá svazek záření s omezeným rozsahem vlnových délek. Z tohoto svazku je pomocí filtru vybírána určitá část spektra. Do cesty takto upraveného svazku záření je vložena kyveta se vzorkem zkoumané látky. Za kyvetou je umístěn detektor, který vyhodnocuje velikost té části záření, která prošla vzorkem. Na výstupu detektoru je elektrický signál, který je úměrný energii, která dopadla na detektor.



Obr. 4.1 Uspořádání spektrofotometru. [8]

Základním principem spektrofotometru je, že pro využití absorpčních vlastností látek k měření jejich koncentrace v dané substanci vybírá nějakou vhodnou malou část elektromagnetického spektra, ve které se absorpční vlastnosti sledované látky nejvíce projeví. [1, 8]

4.1 ZDROJ ZÁŘENÍ

Jako zdroj záření slouží vhodná žárovka nebo výbojka. Žárovky a halogenové (wolframové) žárovky poskytují záření o spojitém spektru ve viditelné a infračervené oblasti, nelze je však použít pro měření v UV oblasti. Problémem žárovek je, že 90 % vyzářené energie leží v infračerveném rozsahu. Zvýšení podílu UV záření a viditelného záření lze dosáhnout zvýšením napájecího napětí (a tím i proudu žárovkou), což však zkracuje významně její životnost. Jako zdroje ultrafialového záření se používají nejčastěji vodíkové nebo deuteriové výbojky. [1,3,8]

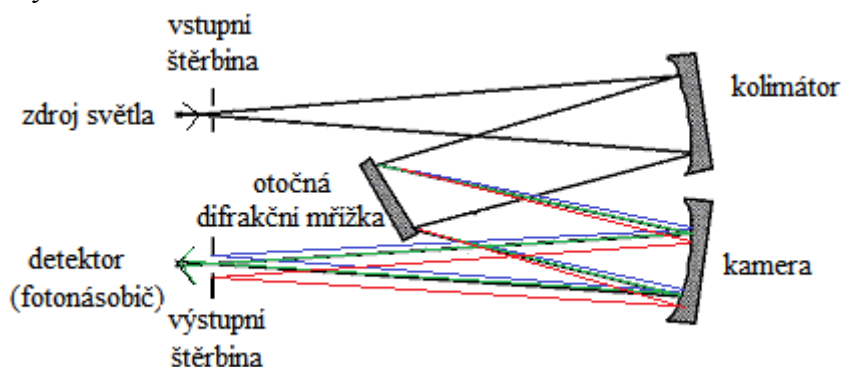
4.2 MONOCHROMÁTOR

Polychromatické světlo následně prochází monochromátorem. Nejjednodušší a nejlevnější možností je zařazení vhodného interferenčního filtru do optické dráhy. Komerčně dostupné jsou dnes filtry prakticky pro libovolnou vlnovou délku ultrafialové a viditelné oblasti. Rozlišuje se několik druhů interferenčních filtrů, jejichž vhodnou kombinací se sestaví filtr požadovaných vlastností. Filtry sdolní propustí propouštějí světlo vlnových délek kratších, než je určitá mez. Filtry shorní propustí naopak propouštějí jen světlo, které má větší vlnovou délku, než je hraniční vlnová délka filtru. Pásmové filtry propouštějí určitý rozsah vlnových délek. Protože hranice nebývají zcela ostré, uvádí se jako dolní a horní mez zpravidla taková vlnová délka, pro kterou má filtr padesátiprocentní transmitanci ve srovnání s vlnovou délkou, kterou propouští nejlépe.

Obvykle jako monochromátor slouží optická mřížka, jejímž nakláněním lze plynule měnit vlnovou délku (např. tzv. Czerny-Turnerův monochromátor – viz Obr. 4.2). Rozsah vlnových délek, které z monochromátoru vycházejí, určuje štěrba, buď pevně nastavená, nebo rovněž nastavitelná. Čím je štěrbina širší, tím větší je intenzita vycházejícího světla, ovšem za cenu menší specifčnosti měření. Naopak užší štěrbina zajistí přesnější dodržení požadované vlnové délky, ovšem za cenu menší intenzity světla a zhoršení odstupu signálu od šumu. [1,3]

Czerny-Turner

Záření prochází vstupní štěrbinou a dopadá na konkávní kolimátorové zrcadlo, které fokusuje záření jako rovnoběžný svazek paprsků na rovinnou difrakční mřížku. Zde dochází k rozkladu polychromatického záření a rozložené monochromatické svazky paprsků pod odpovídajícími difrakčními úhly jsou opět fokusovány konkávním kamerovým zrcadlem do výstupní štěrby monochromátoru. Ze spektra zobrazeného do roviny výstupní štěrby je na detektor propouštěno záření v úzkém spektrálním intervalu, do výstupní štěrby tak dopadá pouze určitý úzký interval vlnových délek $\Delta\lambda$. Vlnová délka záření dopadajícího na detektor se mění natočením mřížky.



Obr. 4.2 Schéma monochromátoru typu Czerny-Turner. [23]

4.3 VZOREK

Monochromatické světlo prochází vzorkem. Většinou se pracuje s roztoky, které se plní do standardních kyvet s optickou dráhou 1 cm. Kyvety se v přístroji umísťují do kyvetátoru, který zajišťuje jejich přesnou polohu, může být temperován a někdy obsahuje i magnetickou míchačku, pomocí níž lze po vložení míchadélka do kyvety promíchávat její obsah během měření. Často bývá možné do kyvetátoru založit najednou několik kyvet, které se pak automaticky vsunují do optické dráhy. Kyvety mohou být vyrobeny z různých materiálů a mohou mít různé provedení.

Kyvety z optického skla se používají pro měření ve viditelné části spektra. Pro měření v UV oblasti je třeba použít kyvet z křemenného skla. Měření v kyvetách z různých typů skla je velmi přesné, kyvety jsou však relativně drahé, přitom životnost kyvet je omezená.

Standardní spektrofotometrické kyvety (tzv. makrokyvety) mají dnes vnitřní rozměry 1x1x3 až 4 cm a plní se na objem 3 ml. Používají se i mikrokyvety a ultramikrokyvety, které umožňují pracovat s menšími vzorky (0,8 ml). Protože by při použití mikro- a ultramikrokyvet v některých spektrofotometrech podstatná část světla procházela sklem kolem vzorku, což by výrazně zvyšovalo pozadí a zhoršovalo přesnost měření, bývají tyto kyvety tzv. maskované – sklo kolem oblasti se vzorkem je začerněno. [1]

4.4 DETEKTOR

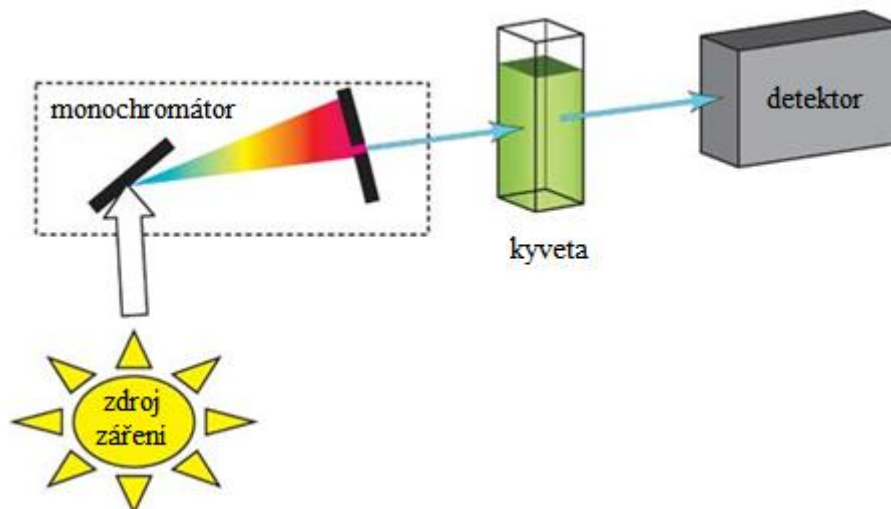
Světlo vycházející ze vzorku dopadá na detektor, zpravidla fotodiodu nebo jiný fotoelektrický prvek. Intenzita se vyhodnotí pomocí systému převodníků, srovná se s intenzitou světla procházejícího slepým vzorkem, a tím se získá absorbance. Přesnost měření ovlivňuje integrační čas – doba, po kterou se absorbance měří. Čím je delší, tím přesnější bude výsledek měření, pokud ovšem není absorbující látka fotocitlivá (tj. pokud nedojde při delším osvitě k vyblednutí vzorku). Nevýhodou dlouhého integračního času je samozřejmě také prodlužování doby měření, což je podstatné zejména při zpracování velkého množství vzorků, při měření při velkém počtu vlnových délek (tj. při měření spekter), nebo při zpracování vzorků, které se v čase mění (kinetická měření).

Kromě tzv. jednopaprskových fotometrů, v nichž se nejprve měří slepý vzorek a pak se do stejné optické dráhy vkládá měřený vzorek, se používají i tzv. dvoupaprskové fotometry, které jsou vybaveny dvěma detektory a umožňují měřit slepý i měřený vzorek současně ve dvou optických drahách. [1]

5. DRUHY SPEKTROFOTOMETRŮ

5.1 ABSORPČNÍ SPEKTROSKOPIE

Zkoumá pohlcování procházejícího elektromagnetického záření analyzovanou látkou, která pohlcuje ty kmitočty, které odpovídají přechodu na vyšší energetickou hladinu. [2]



Obr. 5.1 Základní uspořádání pro absorpční spektrometrii. [20]

5.1.1 ULTRAFIALOVO-VIDITELNÁSPEKTROSKOPIE

Tato metoda využívá pohlcování ultrafialového a viditelného záření měřeným vzorkem. Absorpce při těchto vlnových délkách je způsobena *excitací* valenčních elektronů.

Zdrojem světla je pro UV oblast vodíková nebo deuteriová výbojka a pro VIS oblast lampa se žhnoucím kovovým vláknem. Záření se na mřížce rozkládá a po vytnutí úzkého paprsku štěrbinou prochází monochromatické záření měřeným vzorkem v kyvetě (z křemenného skla pro UV oblast, z obyčejného skla pro VIS oblast). Intenzita prošlého světla je registrována fotonásobičem nebo fotobuňkou.

Spektrofotometrie je jednou z nejrozšířenějších metod v biochemii, zejména pro stanovení koncentrace různých látek. Měření se provádí při vlnové délce, při které roztok maximálně absorbuje, při VIS spektrofotometrii absorpční maximum odpovídá komplementární barvě barva roztoku. [2]

Tab. 5.1 Barvy absorbovaného světla a doplňkové barvy.

Absorbovaná λ (nm)	Barva absorbovaného světla	Komplementární barva
400-435	fialová	žlutozelená
435-480	modrá	žlutá
480-490	zelenomodrá	oranžová
490-500	modrozelená	červená
500-560	zelená	purpurová
560-580	žlutozelená	fialová
580-595	žlutá	modrá
595-605	oranžová	zelenomodrá
605-670	červená	modrozelená

5.1.2 INFRAČERVENÁ SPEKTROFOTOMETRIE

Podstatou absorpčních spekter v infračervené oblasti je excitace *rotačních* a *vibračních* stavů molekul. Infračervená spektra jsou charakteristická pro každou chemickou látku a lze je využít k průkazu různých skupin atomů v molekulách nebo k určení vazebných poměrů v molekule. [2]

Tato technika měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Infračerveným zářením je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78 - 1000 μm , což odpovídá rozsahu kmitočtů 12800 - 10 cm^{-1} . [12]

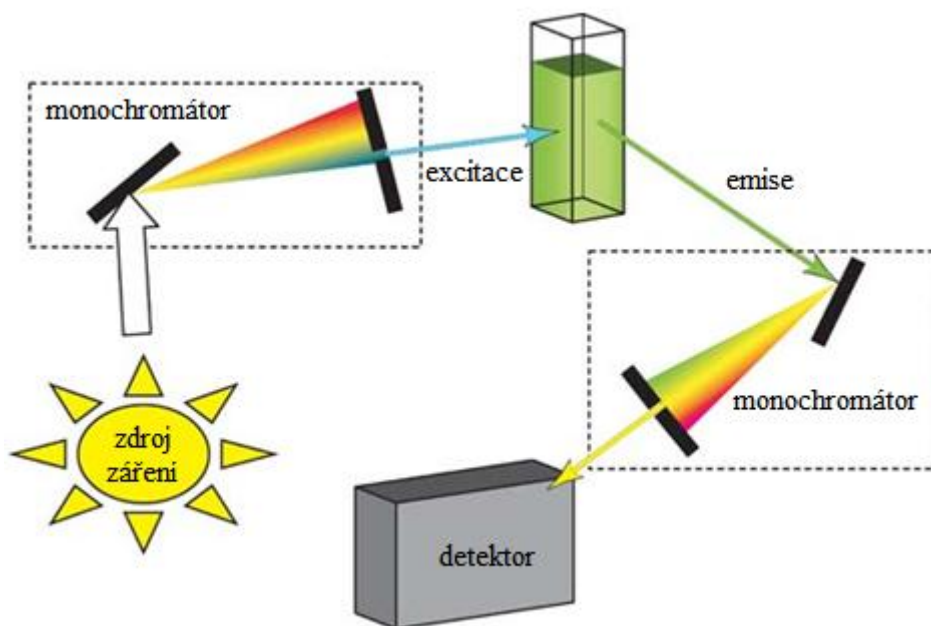
Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance nebo jednotkách absorbance na vlnové délce dopadajícího záření. Absorpční pásy v oblasti 1500 – 400 cm^{-1} jsou nazývané oblastí „otisku palce“ (fingerprint region). [12]

5.2 EMISNÍ SPEKTROSKOPIE

Při těchto metodách dochází po dodání energie k excitaci molekul do vyššího energetického stavu a návrat na původní hladinu je provázen vyzařením energie. [2]

5.2.1 FLUORESCENČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE

Během posledních 20 let se pozoruhodně zvýšil zájem o fluorescenci v oblasti věd. Fluorescenční metody jsou považovány za hlavní výzkumné nástroje v oblasti biochemie a biofyziky. Fluorescenční metody jsou široce využívány v biotechnologii, průtokové cytometrii, lékařské diagnostice, sekvenování DNA, soudním znalectví, genetické analýze a dalších oborech. Fluorescenční detekce je vysoce citlivá, umožňuje aplikovat různé testy a často tak nahrazují metody používající radioaktivních stopových látek. V biomedicině se jedná především o buněčné a molekulární zobrazení. [9, 11]

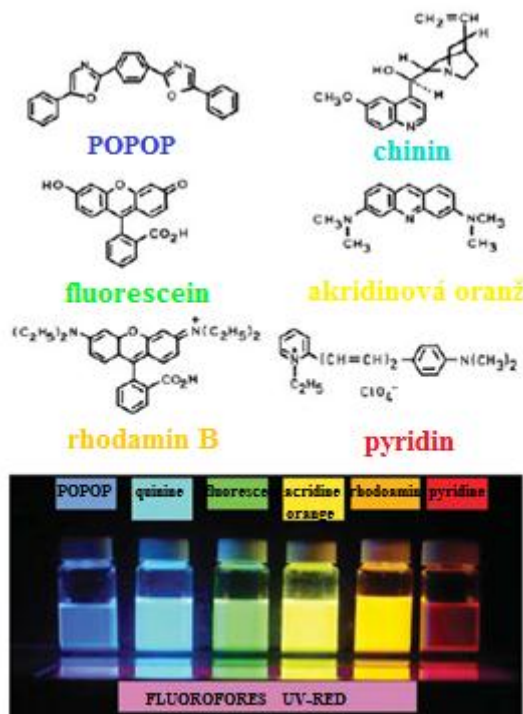


Obr. 5.2 Základní uspořádání pro fluorescenční spektrofotometrii. [20]

Spektrofotometry zahrnují zdroj excitačního záření, dva monochromátory, kyvetu a detektor. Fluorescence je pozorována ve směru *kolmém* vzhledem ke směru primárního záření. Pro sledování viditelné fluorescence se používá UV excitační záření. [2]

Široce využívaným fluoroforem je chinin. Chinin ve sklenici v tonické vodě je excitován ultrafialovým světlem ze slunce. Po návratu do základního stavu emituje modré světlo s vlnovou délkou 450 nm. Prvním pozorovatelem fluorescence s využitím roztoku chininu byl *Sir John Frederick William Herschel* v roce 1845. [9]

Obr. 5.3 nabízí ukázkou běžně používaných fluoroforů, jejich chemickou strukturu a zbarvení. Intenzita luminiscence každé látky závisí na vlnové délce (emisní spektrum).



Obr. 5.3 Struktura typických fluoroforů.[9]

6. EXPERIMENTY

Tato kapitola pojednává o experimentech, které umožňují laboratorní školní spektrometry USB2000+ a USB650 Red Tide. Přístroje mohou měřit absorbanci, koncentraci, transmitanci, reflexi, ozáření a fluorescenci. Spektrometry jsou propojeny s PC a všechny výpočty a grafické znázornění probíhají v programu SpectraSuite. V následujícím textu jsou uvedeny nejen principy experimentů a schémata nastavení měřicího pracoviště, ale i matematické vztahy, pomocí kterých SpectraSuite počítá měřené veličiny.

6.1 ABSORBANCE

Absorbance spektra je množství světla, které pohltí vzorek. U většiny vzorků absorbance lineárně odpovídá koncentraci látky.

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \right), \quad (6.1)$$

kde S_{λ} je intenzita záření vstupujícího do vzorku při vlnové délce λ ,
 D_{λ} je intenzita záření pozadí při vlnové délce λ ,
 R_{λ} je referenční intenzita záření při vlnové délce λ .

Typické nastavení pro měření absorbance (Obr. 6.1): světelný zdroj (zcela vpravo) odešle světlo vstupním optickým vláknem do kyvety umístěné v držáku na kyvetu (dole uprostřed). Světlo prochází vzorkem. Vystupující vlákno přenáší světlo ze vzorku do spektrometru (nahore uprostřed), který je připojen k počítači (zcela vlevo).



Obr. 6.1 Schéma nastavení pro měření absorbance. [14]

6.2 KONCENTRACE

Pro zjištění neznámé koncentrace látky v roztoku je třeba nejprve vzít sérii roztoků s různými známými koncentracemi stejné látky. Nejprve se vloží absorpční spektrum roztoku o nejvyšší známé koncentraci. Referenční spektrum se uloží, pak se vloží kyveta s rozpouštědlem do držáku na kyvetu. Existují dva způsoby, které lze použít pro výpočet koncentrace vzorku (viz kapitola 2.1): použití Lambert–Beerova zákona, kalibrace z roztoku o známé koncentraci. [14]

6.3 TRANSMITANCE

Transmittance je procento světla, které prochází vzorkem v poměru k množství, které do vzorku vstoupí. Transmitanci lze také vyjádřit jako část světla odraženého na stěnách kyvety a v optice fotometru, neboť pro měření transmittance (hmotou propuštěné záření) a reflexe (odražené záření) se používají stejné matematické výpočty. Transmittance se vyjadřuje v procentech vzhledem k slepému vzorku (např. vzduch).

$$T_{\lambda} = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \cdot 100\%, \quad (6.2)$$

kde S_{λ} je intenzita záření vstupujícího do vzorku při vlnové délce λ
 D_{λ} je intenzita záření pozadí při vlnové délce λ
 R_{λ} je referenční intenzita záření při vlnové délce λ

Typické nastavení transmittance (Obr. 6.2): světelný zdroj (zcela vpravo) vysílá světlo vstupní transmittanční sondou do nádoby (dole uprostřed). Světlo reaguje se vzorkem. Výstupní transmittanční sonda nese informaci do spektrometru (nahore uprostřed), který přenáší informaci do počítače (zcela vlevo). [14]



Obr. 6.2 Schéma nastavení pro měření transmittance. [14]

6.4 REFLEXE

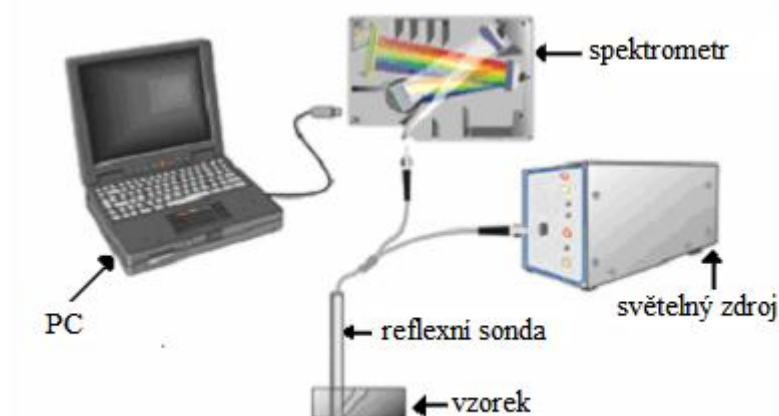
Reflexe je zpětný odraz záření, aniž by se změnila vlnová délka. Odraz může být buď zrcadlový (úhel dopadu se rovná úhlu odrazu), nebo difúzní (úhel dopadu se nerovná úhlu odrazu). Každý povrch vrací oba odrazy – zrcadlový i difúzní. Některé povrchy mohou vrátit především zrcadlový odraz, zatímco jiné mohou vrátit především difúzní odraz. Zrcadlový odraz roste úměrně s množstvím lesku na povrchu.

Reflexe je vyjádřena v procentech vzhledem k odrazu od standardní referenční látky:

$$R_{\lambda} = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \cdot 100\%, \quad (6.3)$$

kde S_{λ} je intenzita záření vstupujícího do vzorku při vlnové délce λ
 D_{λ} je intenzita záření pozadí při vlnové délce λ
 R_{λ} je referenční intenzita záření při vlnové délce λ

Následující obrázek (Obr. 6.3) ukazuje typické nastavení reflexe. Světelný zdroj vysílá světlo vstupní reflexní sondou do vzorku. Držák reflexní sondy drží sondu v 90° nebo 45° úhlu od povrchu. Výstupní reflexní sonda přenáší světlo ze vzorku do spektrometru, který je připojen k PC.



Obr. 6.3 Schéma nastavení pro měření reflexe. [14]

Běžné reflexní aplikace zahrnují měření vlastností zrcadel a nátěrů. Další aplikace zahrnují měření vizuálních vlastností barvy v barvách (malířských), plastech a potravinářských výrobcích. [14]

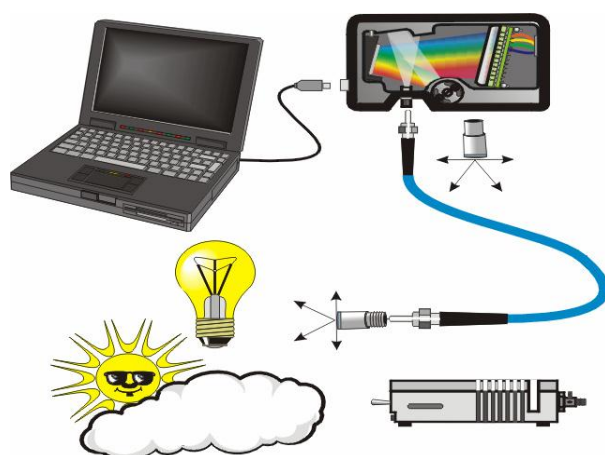
6.5 INTENZITA VYZAŘOVÁNÍ

Intenzita vyzařování je množství energie, kterou vzorek vyzáří (emituje) v závislosti na vlnové délce. Absolutní intenzita vyzařování je množství světla v absolutních členech. Relativní intenzita vyzáření je podíl energie vyzařujícího vzorku a energie vzorkovacího sběrného systému (z žárovek) s energií černého tělesa (Slunce). Při dané teplotě vyzařuje černé těleso záření všech vlnových délek. Přitom ale záření s různou vlnovou délkou mají různou intenzitu. SpectraSuite vypočítává relativní intenzitu vyzáření rovnicí:

$$I_{\lambda} = B_{\lambda} \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \quad (6.4)$$

kde S_{λ} je intenzita záření vstupujícího do vzorku při vlnové délce λ
 D_{λ} je intenzita záření pozadí při vlnové délce λ
 R_{λ} je referenční intenzita záření při vlnové délce λ
 B_{λ} je referenční relativní energie (počítá se od teploty barev) při vlnové délce λ

Typické nastavení relativního vyzařování (Obr. 6.4): Použitý světelný zdroj se známou barevnou teplotou (například LS-1 nebo LS-1-LL (vpravo dole)) se bere jako referenční spektrum. Světlo pro měření (vlevo dole) se akumuluje přes CC-3 Cosine korektor (nebo FOIS kulový integrátor) do vstupního vlákna, které přenáší světelnou informaci do spektrometru. Spektrometr pak přenáší informaci do počítače, který porovnává naměřené spektrum proti referenčnímu spektru, a tak odstraní vlnové délky závislé na přístroji měřící odezvu.



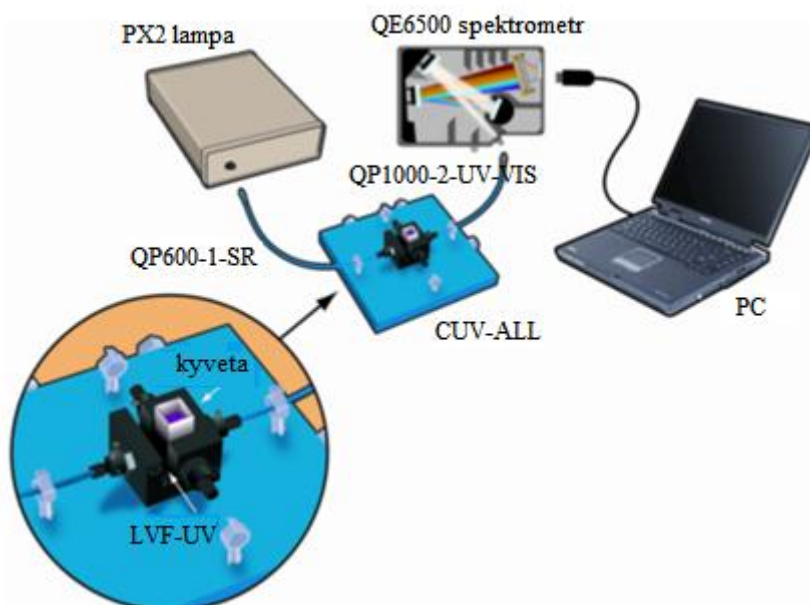
Obr. 6.4 Schéma nastavení měření vyzařování. [14]

U měření *absolutního vyzařování* není nutné nejprve uložit referenční spektrum absolutního vyzařování, ale musí se ukládat tmavé spektrum a je nutné mít kalibrační soubor předtím, než se bude měřit absolutní ozáření.

Relativní vyzařování je měření světla vzhledem ke známé barevné teplotě černého tělesa. Běžné aplikace zahrnují charakterizující výstup světla z elektroluminiscenčních diod (LED), žárovek a jiných zářivých zdrojů energie jako je sluneční světlo. Měření relativního vyzařování zahrnují měření fluorescence, které měří energii poskytnutou světlem excitovaných materiálů na kratších vlnových délkách. Před měřením relativní intenzity vyzařování musí být uloženo referenční a tmavé spektrum. [14]

6.6 FLUORESCENCE

Měření fluorescence je typ měření relativního vyzařování, ve kterém se měří energie světlem excitovaných materiálů při kratších vlnových délkách. Typické nastavení je uvedeno na Obr. 6.5. Vlákná pro zdroj světla (lampa) a pro spektrometr musí být v úhlu 90° . [14]



Obr. 6.5 Měření fluorescence. [14]

7. PRAKTICKÁ ČÁST

7.1 MĚŘENÍ KONCENTRACE ROZTOKŮ KMnO_4

Úkol: Připravit sérii kalibračních roztoků ředěním standardního roztoku o známé molární koncentraci (roztok manganistanu draselného). Proměřit absorpční spektra kalibračních roztoků. Z hodnot naměřených absorbancí a známých koncentrací sestavit kalibrační graf. Stanovit koncentraci neznámých roztoků z grafu a výpočtem pomocí kalibračního faktoru.

Potřeby k měření: Manganistan draselný ($M_{\text{KMnO}_4} = 158,03 \text{ g/mol}$), destilovaná voda, pipety (2 ml), kyvety (1,5 ml; 12,5x12,5x45 mm), kádinka (50 ml), analytické váhy, spektrofotometr USB2000+ (viz příloha B).

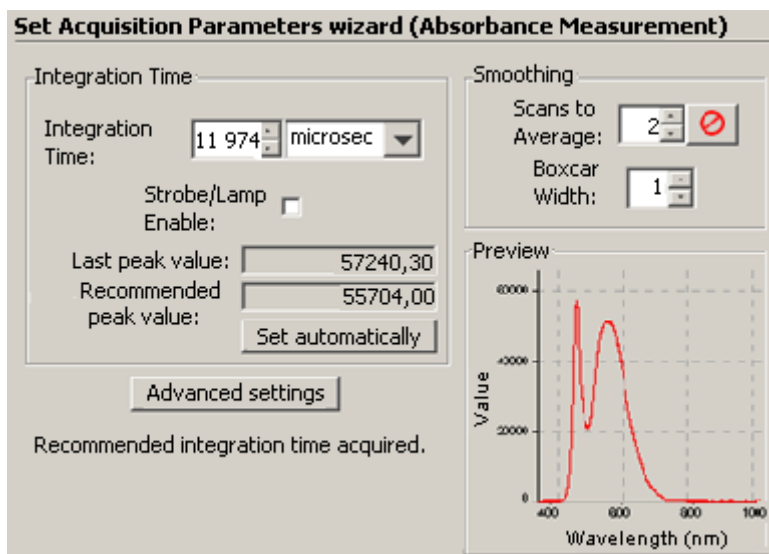
Pracovní postup: V prvním kroku byly připraveny kalibrační roztoky. Bylo naváženo 0,751 g manganistanu draselného. Smísením naváženého množství KMnO_4 s 20 ml destilované vody byl připraven zásobní roztok o koncentraci 0,23761 mol/l. Koncentrace zásobního roztoku byla vypočtena dle vztahu:

$$c = \frac{m}{MV}, \quad (7.1)$$

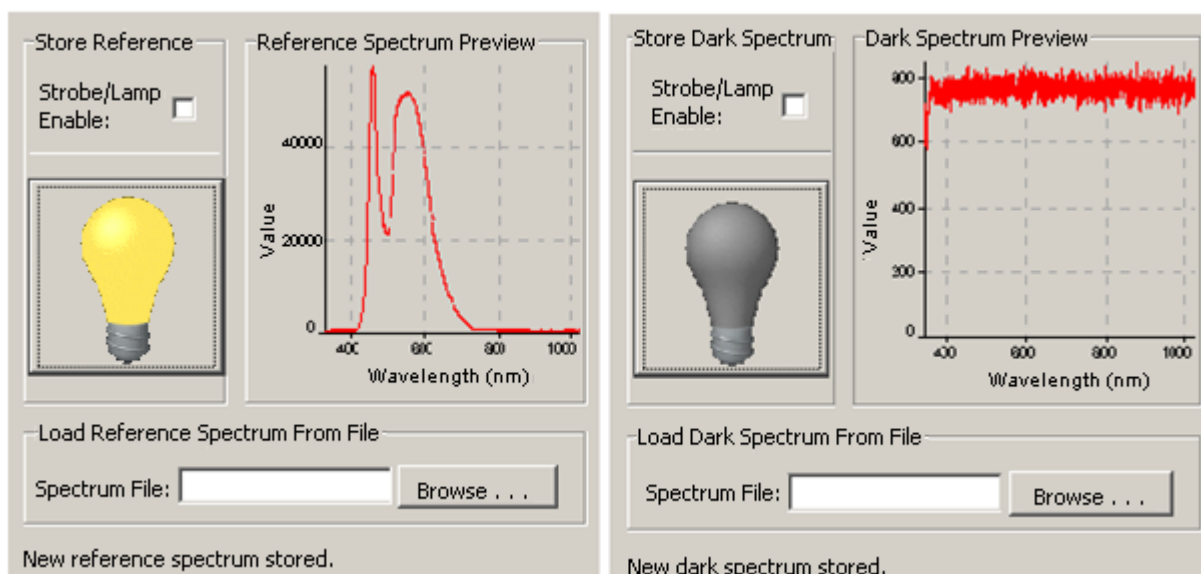
kde c je látková koncentrace rozpuštěné látky, m hmotnost rozpuštěné látky, M molekulová hmotnost látky, V objem roztoku.

Bylo připraveno 6 kalibračních roztoků ředěním zásobního roztoku o molární koncentraci nižší 0,01 mol/l. Referenčním roztokem byla destilovaná voda. Následovalo proměření absorpčního spektra některého z roztoků a určení maximální absorbance pro následné měření koncentrace. U vzorku č. 2 byla naměřena maximální absorbance při $\lambda = 555 \text{ nm}$. Absorbance pro různě koncentrované roztoky KMnO_4 byla měřena při této vlnové délce. Ze známých hodnot koncentrací a naměřených hodnot absorbancí byla sestavena kalibrační křivka, ze které se po změření absorbance analyzovaného vzorku odečetla koncentrace. Z kalibrační křivky byl určen molární absorpční koeficient a následně použit pro výpočet koncentrace dle Lambert-Beerova vztahu.

Naměřená a zpracovaná data:



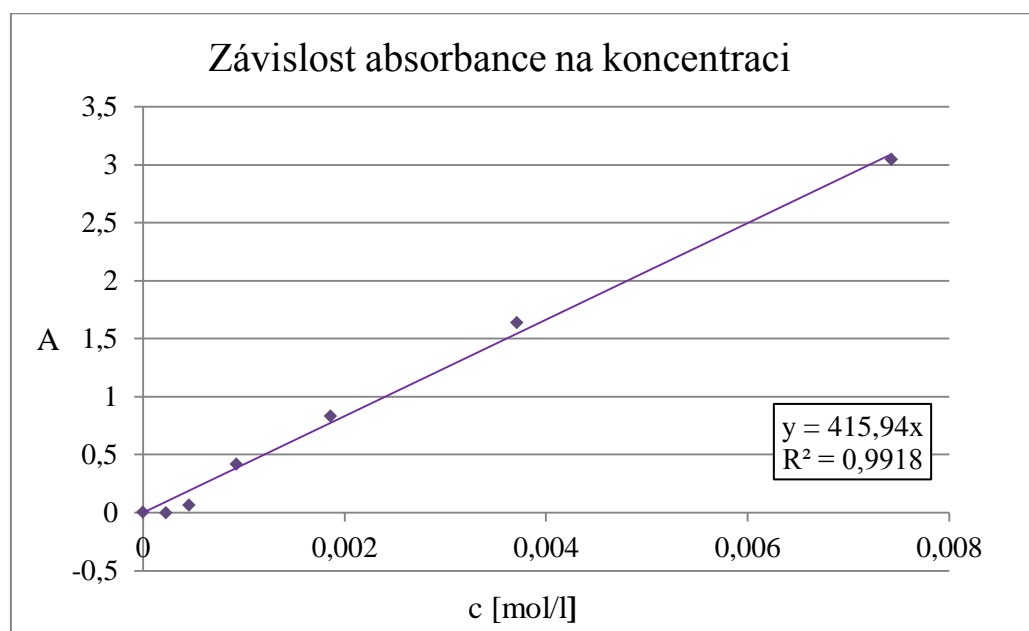
Obr. 7.1 Měření absorbance – nastavení akvizičních parametrů (použitý zdroj – bílé světlo).



Obr. 7.2 Nastavení spektra: vlevo referenční spektrum, vpravo tmavé spektrum bílého světla.

Tab. 7.1 Absorbance roztoků KMnO_4 .

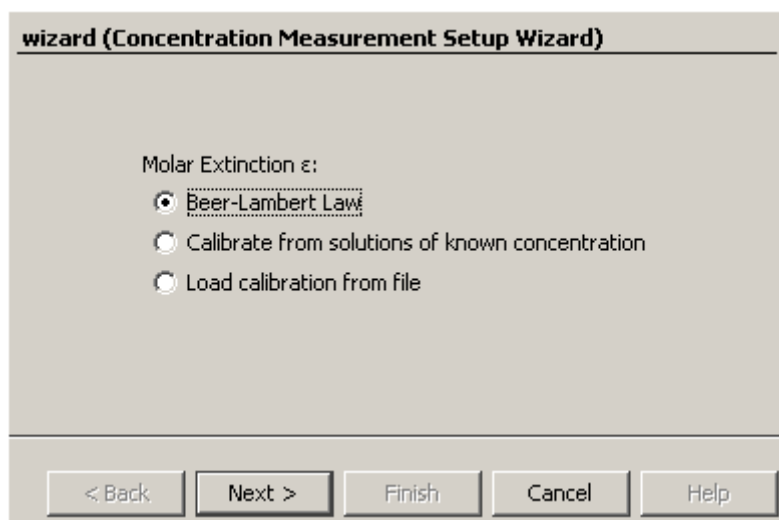
Roztok č.(i)	c [mol/l]	A $\lambda = 555 \text{ nm}$
1.	0,00743	3,042
2.	0,00371	1,632
3.	0,00186	0,828
4.	0,00093	0,414
5.	0,00046	0,063
6.	0,00023	-0,067



Obr. 7.3 Kalibrační křivka.

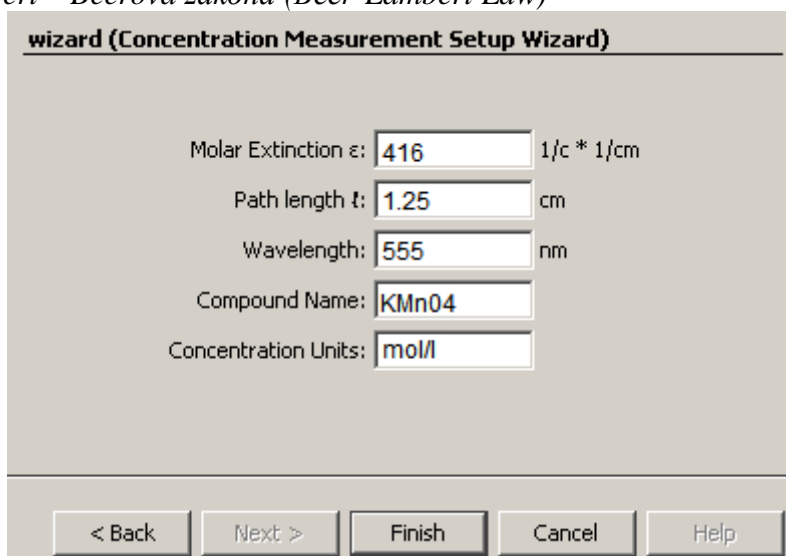
Tvar křivky je lineární. Obecnou rovnicí přímky je $y = kx + q$. Pokud přímka prochází počátkem, pak q se rovná 0. Při měření stejného analytu při stejné vlnové délce a ve stejné kyvetě je tvar $l \cdot \epsilon$ konstantní a Lambert-Beerova rovnice může mít pak tvar $A = kc$, kde k je konstanta odpovídající molárnímu absorpčnímu koeficientu ϵ . Může se psát: $y = kx \sim A = kc$, tedy molární absorpční koeficient odpovídá hodnotě 415,94.

Koncentrace se v programu SpectraSuite dá určit třemi způsoby:



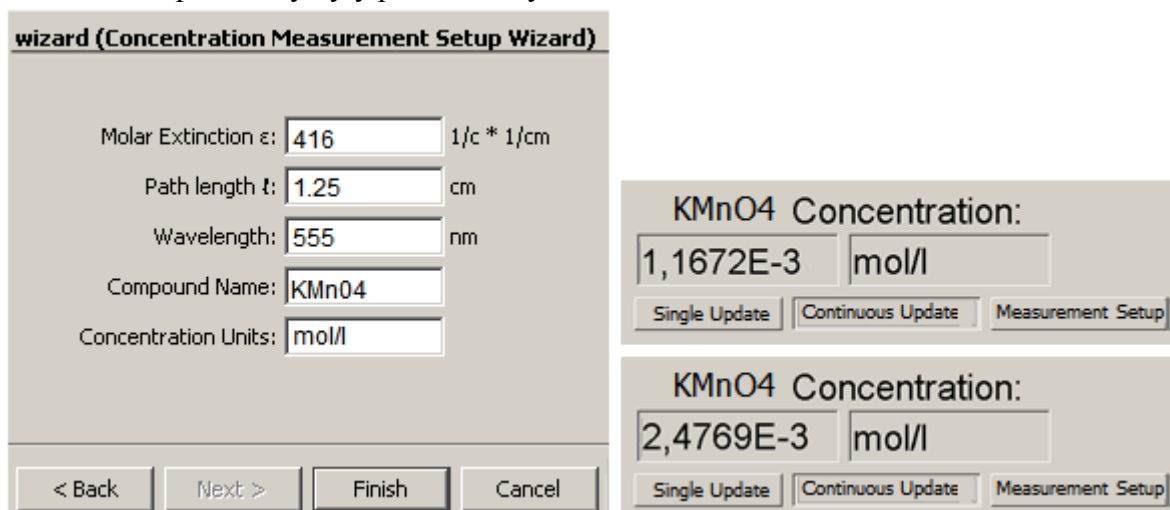
Obr. 7.4 Měření koncentrace.

1. Použití Lambert – Beerova zákona (Beer-Lambert Law)



Obr. 7.5 Nastavení měření koncentrace KMnO₄.

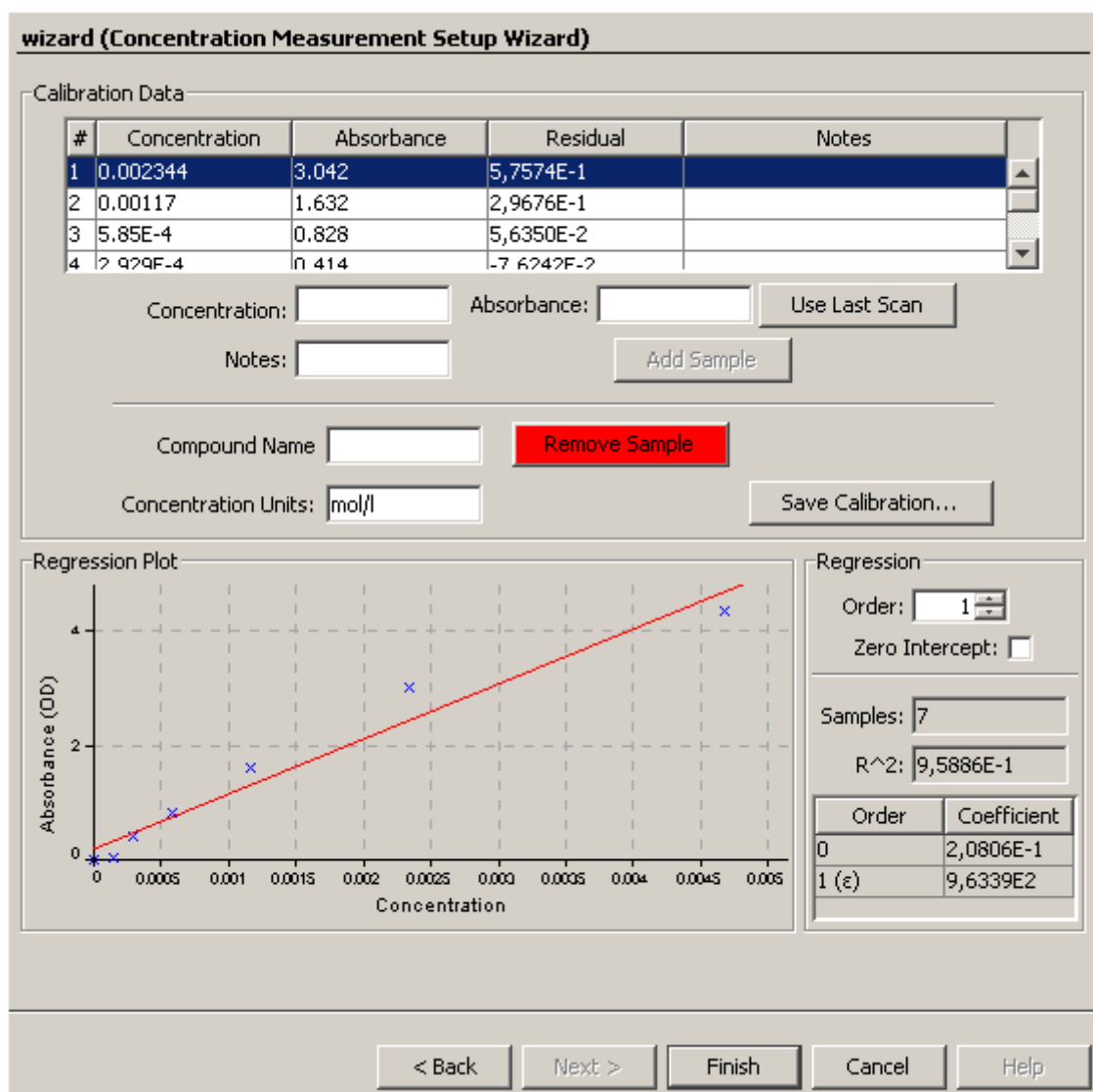
Pro nastavené parametry byly pak změřeny koncentrace dvou roztoků.



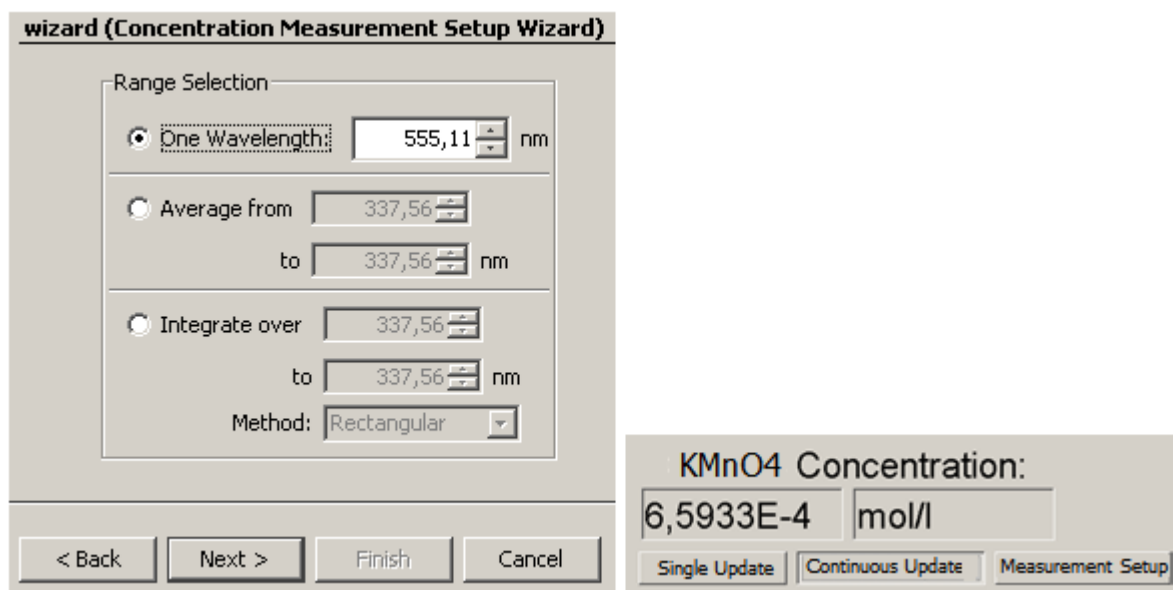
Obr. 7.6 Výsledek měření koncentrace dvou různých roztoků.

2. Kalibrace z roztoků o známé koncentraci (Calibrate from solutions of known concentrations)

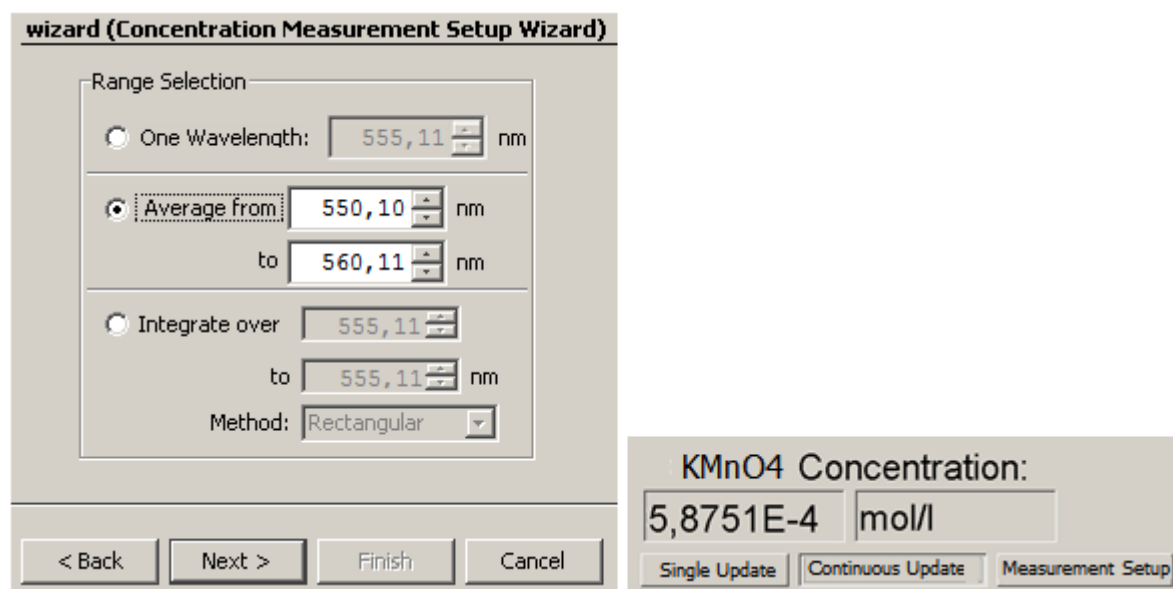
Tento typ měření nabízí ze tří možností nastavení vlnové délky, při které bude probíhat měření. Program umožňuje vybrat jedinou vlnovou délku, kde je absorbance vzorku největší (*One Wavelength*). Umožňuje průměrovat (*Average from to*) nebo integrovat (*Integrate over to*) na celém rozsahu vlnových délek. Po nastavení vlnové délky se zobrazí okno pro nastavení kalibračních dat a vytvoření kalibrační přímky, viz Obr. 7.7.



Obr. 7.7 Kalibrační data, kalibrační křivka KMnO₄.



Obr. 7.8 Výsledek naměřené koncentrace při jediné vlnové délce, a to 555,11 nm.



Obr. 7.9 Výsledek naměřené koncentrace v rozsahu vlnových délek.

Diskuze: V programu SpectraSuite bylo vyzkoušeno měření koncentrace neznámých roztoků různými způsoby. Podrobný postup měření v programu SpectraSuite a popis parametrů je uveden v příloze A. Měření v tomto programu je jistě výhodnější a rychlejší, jelikož program s menší pomocí uživatele vytvoří kalibrační graf a dokáže okamžitě měřit koncentrace různých roztoků s tím, že uživatel jen mění kyvety analyzovaných vzorků.

7.2 OVĚŘENÍ PLATNOSTI LAMBERT-BEEROVA ZÁKONA

Úkol: Ověřte platnost Lambert-Beerova zákona pro různě koncentrované roztoky.

Materiál: Potravinářské barvivo červeň jahodová (výrobce AROCO, spol.s.r.o), destilovaná voda, pipeta (2 ml), stříkačka (10 ml), Erlenmeyerova širokohrdlá baňka (25 ml), kádinka (50 ml), kyvety (1,5 ml; 12,5x12,5x45 mm), analytické váhy, spektrofotometr USB650.

Složení barviva:

- E 122 Azorubin (red) – chemický název Dinatrium-4-hydroxy-3-(4-sulfonat-1-naftylazo)naftalen-1-sulfonát. $M = 502,44 \text{ g/mol}$. A_{\max} při 516 nm.
- E 102 Tartrazin (yellow) – chemický název Trinatrium-5-hydroxy-1-(4-sulfonatfenyl)-4-(4-sulfonatfenylazo)-H-pyrazol-3-karboxylát. $M = 534,37 \text{ g/mol}$. A_{\max} při 426 nm.
- E 110 Oranžová žlutá SY (yellow) – chemický název 2-hydroxy-1-(4-sulfonanofenylazo) naftalen-6-sulfonan disodný. $M = 452,37 \text{ g/mol}$. A_{\max} při 485 nm. [26]

Provedení: Bylo naváženo 53,6 mg potravinářského barviva. Toto množství bylo rozpuštěno v 20 ml destilované vody. Postupným ředěním byly připraveny další vzorky. Pro více koncentrovanější roztoky bylo naváženo 516 mg barviva a toto množství rozpuštěno v 5 ml destilované vody. Ředěním bylo připraveno prvních 5 roztoků.

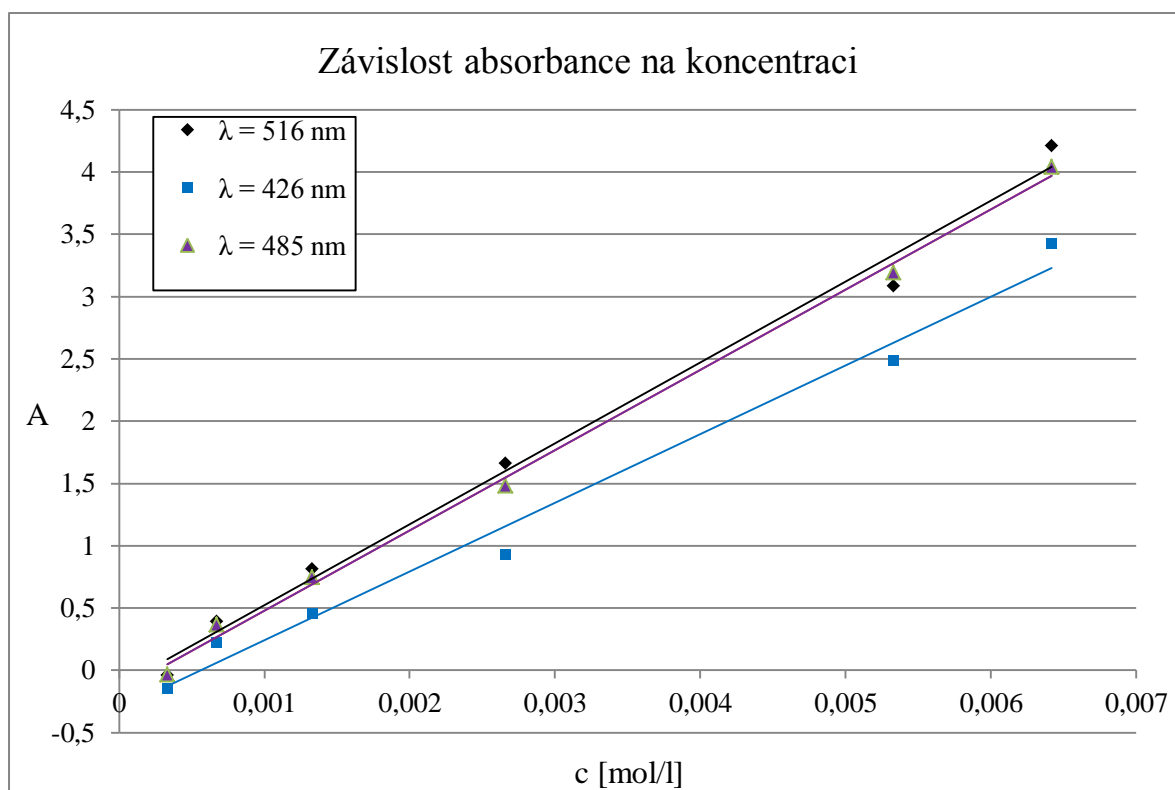
Byla změřena absorbance odpovídající tabelové hodnotě vlnové délky každé látky, která byla obsažena v barvivu. Látková koncentrace byla vypočtena ze známé hmotnosti, objemu a molární hmotnosti. Jelikož se v roztoku nachází 3 různé látky a jejich absorbance jsou v poměru 1:0,8:1, pro výpočet koncentrace byla použita průměrná hodnota molární hmotnosti všech látek v daném poměru.

Bylo použito bílé světlo (světelný zdroj), scan to average 20, boxcar width 2.

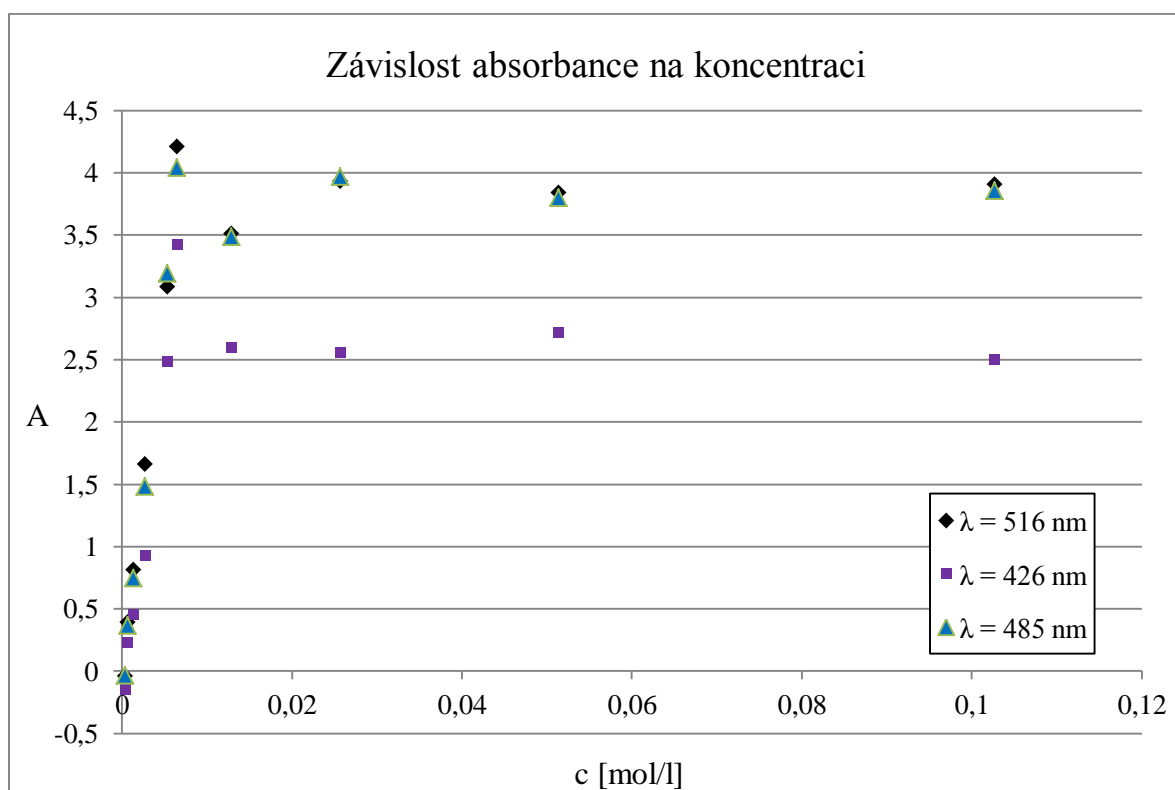
Naměřená a zpracovaná data:

Tab. 7.2 Naměřené hodnoty absorbancí.

Roztok	A $\lambda = 516 \text{ nm}$	A $\lambda = 426 \text{ nm}$	A $\lambda = 485 \text{ nm}$	c [mol/l]
1.	3,907	2,506	3,856	0,10270
2.	3,840	2,722	3,801	0,05135
3.	3,934	2,560	3,970	0,02568
4.	3,512	2,597	3,486	0,01284
5.	4,210	3,423	4,043	0,00642
6.	3,084	2,483	3,195	0,00533
7.	1,660	0,926	1,482	0,00266
8.	0,813	0,458	0,746	0,00133
9.	0,393	0,227	0,367	0,00067
10.	-0,037	-0,147	-0,031	0,00033



Obr. 7.10 Kalibrační křivky. Červeně označené hodnoty absorbancí byly změřeny při vlnové délce 516 nm, tedy při takové maximální vlnové délce, kterou vykazuje azorubin. Tartrazin absorbuje při vlnové délce 426 nm (černě zbarvená křivka), oranžová žluť při 485 nm (zeleně zbarvená křivka).



Obr. 7.11 Graf zobrazuje nelinearitu při použití koncentrace vyšší 0,01 mol/l.

Diskuze: U roztoků při vyšších hodnotách koncentrace přestává platit Lambert Beerův zákon. Podmínkou platnosti zákona jsou koncentrace nižší 0,01 mol/l. Pokud je tato podmínka splněna, závislost koncentrace na absorbanci je lineární. Při vyšších koncentracích přestává platit lineární závislost. Při koncentracích vyšších se uplatňuje závislost molárního absorpčního koeficientu na indexu lomu měřeného roztoku.

7.3 MĚŘENÍ FLUORESCENCE

Úkol: Proměřit excitačně emisní spektra fluoresceinu o různých koncentracích. Měření provést v roztoku etylalkoholu. Vyhodnotit naměřená data.

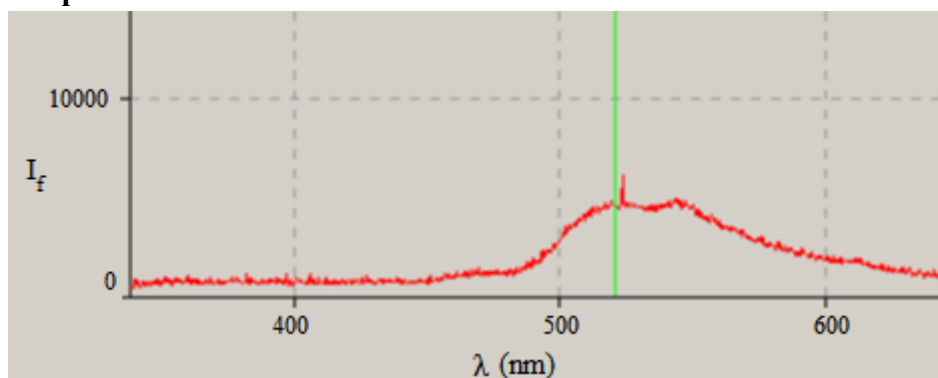
Materiál: Fluorescein (firma Fluka Analytical, $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$, $M = 332,31 \text{ g/mol}$, $\text{pH} = 8$), ethylalkohol (96%), pipety (2 ml), stříkačka (10 ml), Erlenmeyerova širokohrdlá baňka (25 ml), kyvety (1,5 ml; 12,5x12,5x45 mm), analytické váhy, magnetická míchačka, spektrofotometr USB2000+, USB650 RedTide (viz příloha B).

Provedení: Na analytických vahách bylo naváženo 23,5 mg fluoresceinu. Toto množství bylo rozpuštěno v 20 ml etanolu. Pro důkladné rozpuštění fluoresceinu byl roztok 30 min míchán na magnetické míchačce. Po této době bylo odebráno 10 ml roztoku, ke kterému bylo přidáno 10 ml etanolu. Tímto způsobem byly připraveny další 3 vzorky. Referenčním vzorkem byl etanol. Molární koncentrace odpovídající těmto vzorkům jsou uvedeny v tabulce 7.3.

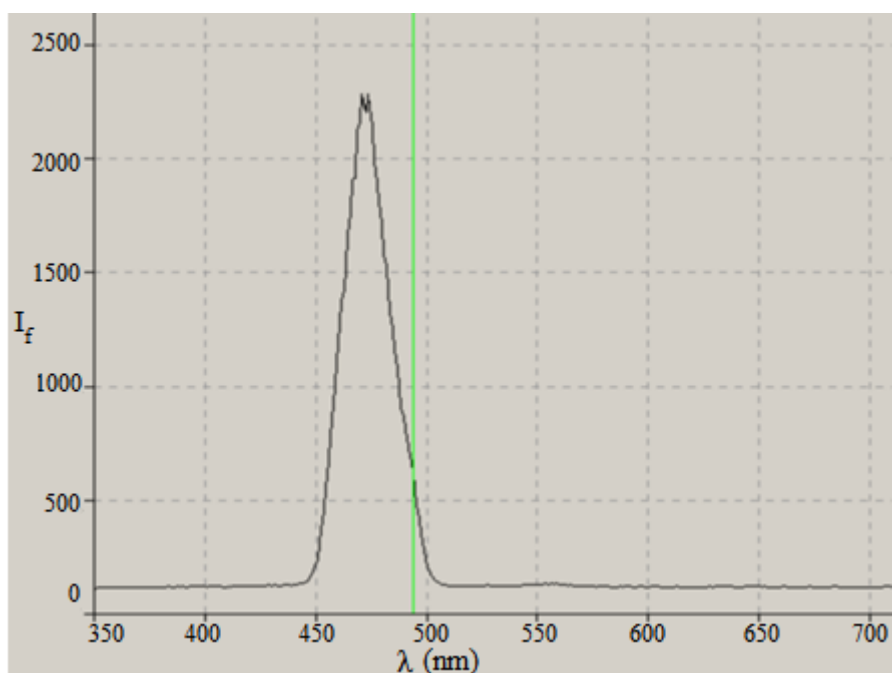
Dalším krokem bylo sestavení měřicího pracoviště. Spektrometry byly zapojeny dle Obr. 6.5. Spektrometr, který detekuje fluorescenci, musí být v úhlu 90° . Byl začleněn lineární variabilní filtr k vymezení úzkého spektra potřebného pro měření. Filtrem byl nastaven signál zdroje tak, aby vrcholy spektra nebyly mimo rozsah (snížení úrovně osvětlení pomocí filtru).

Měření fluorescence bylo zahájeno pomocí *File* → *New* → *New Gated Fluorescence Measurement*. V následujících krocích byl vybrán zdroj, byly nastaveny parametry pro sběr dat, referenční spektrum, tmavé spektrum. Nastavení: I_f - integrační čas 1 s, scans to average 1, boxcar width 0; A - integrační čas 58 ms, scans to average 5, boxcar width 3.

Naměřená a zpracovaná data:



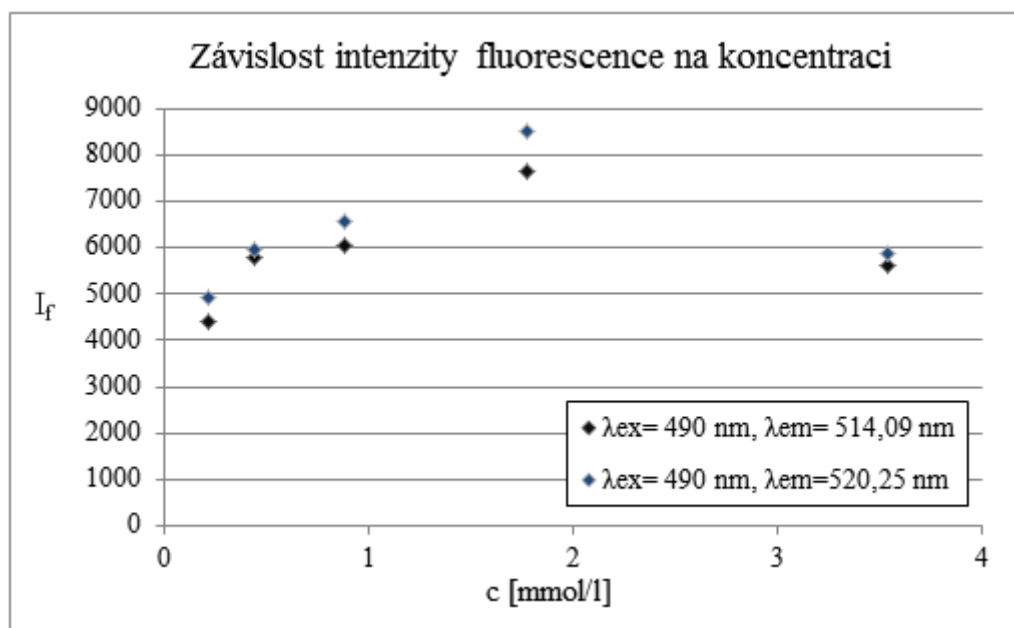
Obr. 7.12 Emisní spektrum 5. vzorku, měřeno při $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, maximální intenzita fluorescence odpovídá $\lambda_{\text{em}} = 520,25 \text{ nm}$.



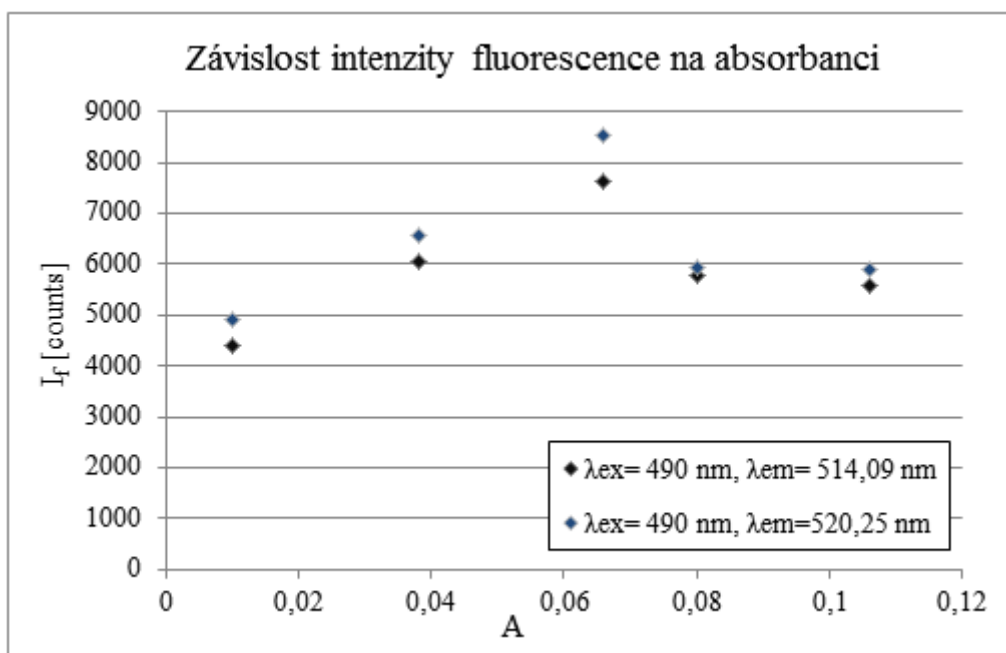
Obr. 7.13 Excitační spektrum 5. vzorku, $\lambda_{em}=520,25$ nm.

Tab. 7.3 Vypočtené koncentrace vzorků. Naměřené hodnoty fluorescence.

Vzorek	Fluorescein [mg]	Etanol [ml]	c [mmol/l]	I_f $\lambda_{ex}=490\text{nm},$ $\lambda_{em}=514,09\text{nm},$	I_f $\lambda_{ex}=490\text{nm},$ $\lambda_{em}=520,25\text{nm}$	A při $\lambda_{em}=514,09\text{nm}$
1	23,50	20	3,54	5597	5891	0,106
2	11,75	20	1,77	7631	8529	0,066
3	5,88	20	0,88	6045	6553	0,038
4	2,94	20	0,44	5767	5941	0,080
5	1,47	20	0,22	4397	4926	0,010



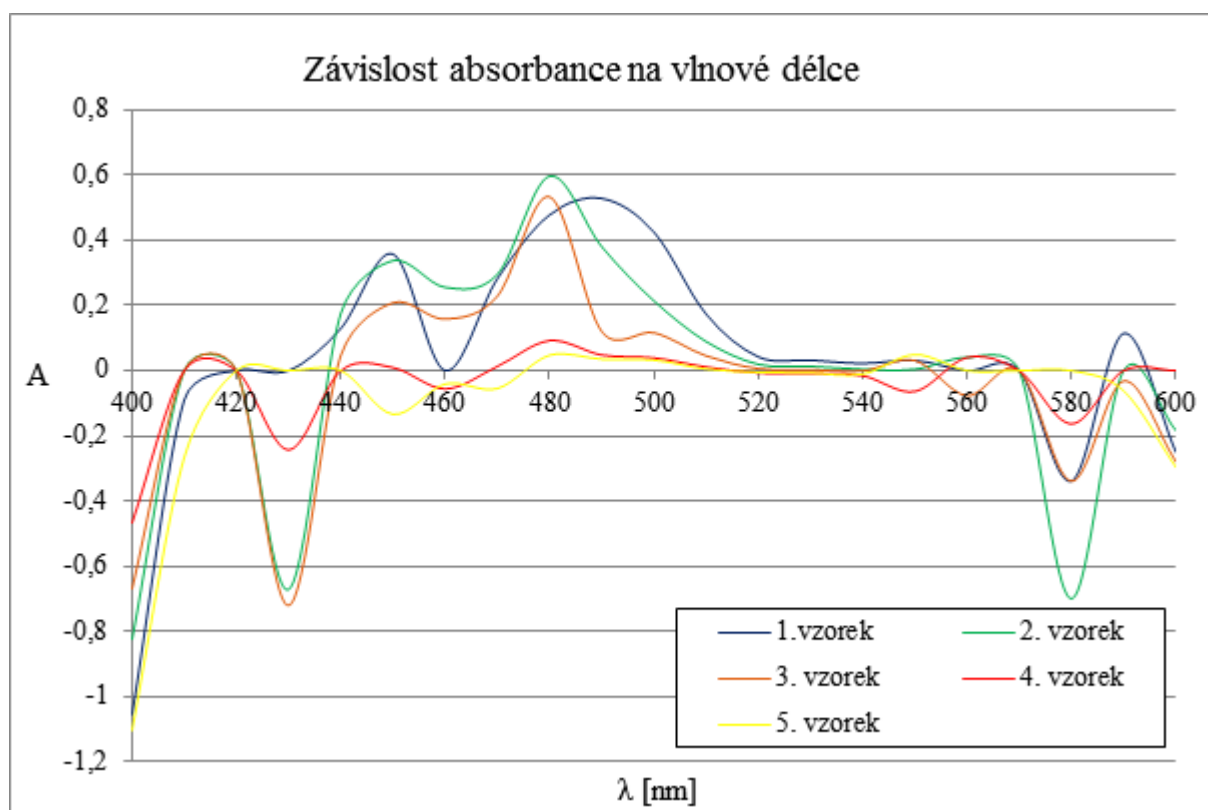
Obr. 7.14 Fluorescence závislá na koncentraci fluoresceinu. Černé značky odpovídají intenzitě fluorescence měřené při doporučené emisní vlnové délce. Modré značky odpovídají intenzitě fluorescence měřené při maximální vlnové délce určené z grafu (viz Obr. 7.12).



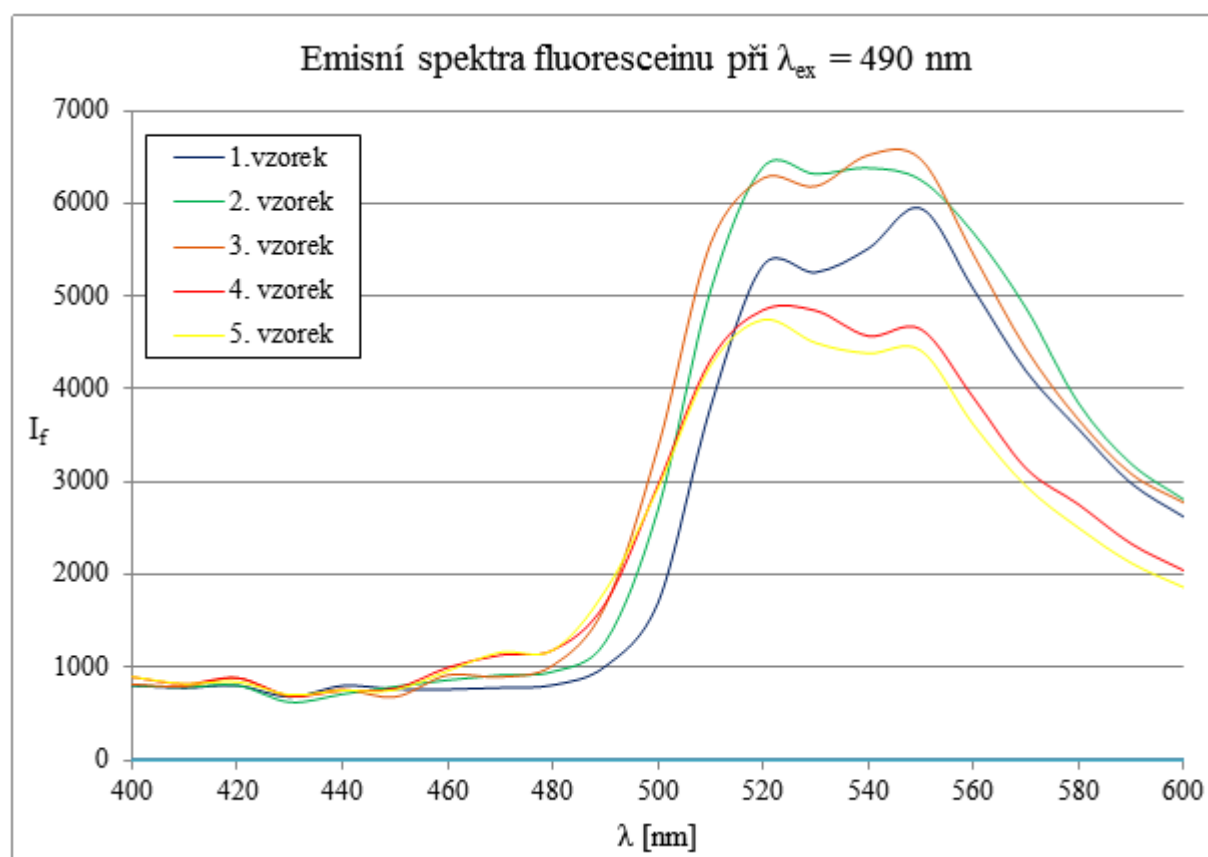
Obr. 7.15 Fluorescence závislá na absorbanci.

Tab. 7.4 Naměřené hodnoty absorbance a intenzity fluorescence.

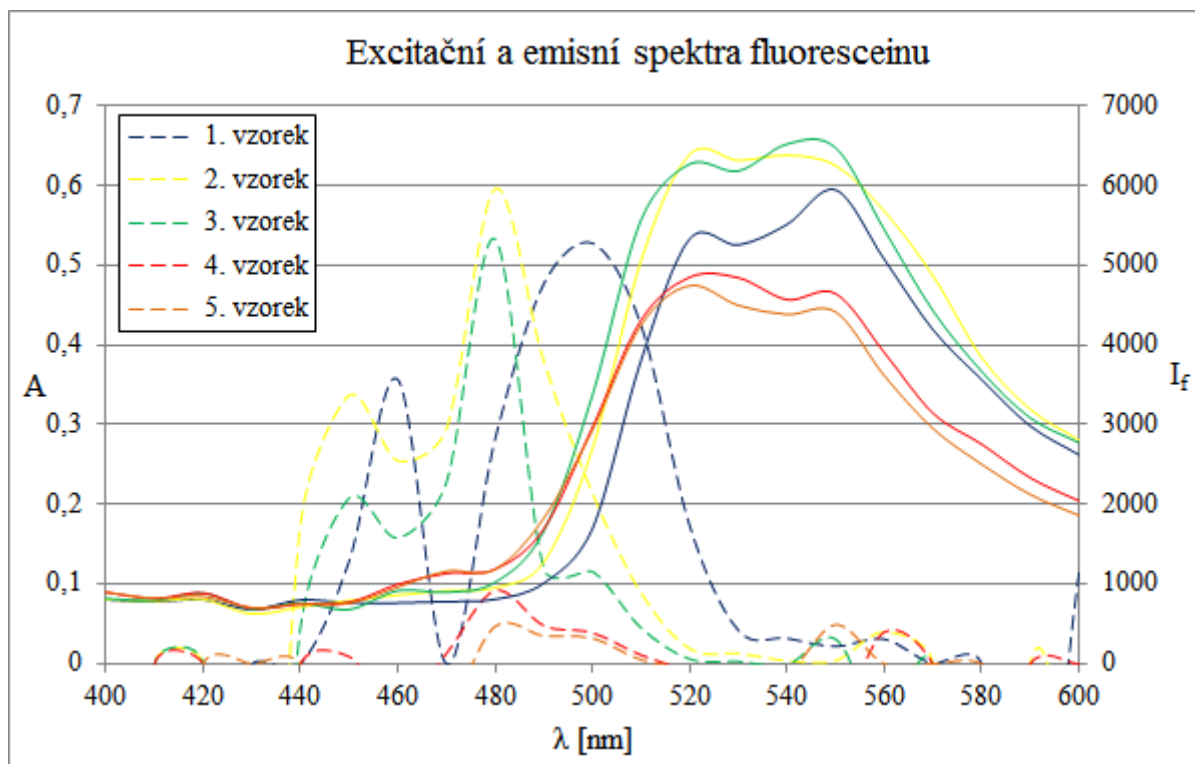
λ [nm]	1. vzorek		2. vzorek		3. vzorek		4. vzorek		5. vzorek	
	A	I_f [cps]	A	I_f [cps]	A	I_f [cps]	A	I_f [cps]	A	I_f [cps]
400	-1,054	805	-0,824	807	-0,669	819	-0,467	897	-1,103	899
410	-0,09	780	0	786	0	795	0	820	-0,266	823
420	0	805	0	807	0	886	0	888	0	845
430	0	682	-0,671	626	-0,72	687	-0,243	696	0	706
440	0,129	802	0,176	712	0,047	762	0	750	0	751
450	0,357	766	0,337	793	0,208	682	0,009	771	-0,134	757
460	0	764	0,255	863	0,158	917	-0,056	998	-0,041	962
470	0,282	781	0,295	917	0,228	897	0,013	1134	-0,055	1163
480	0,477	809	0,596	954	0,533	1021	0,092	1186	0,047	1186
490	0,528	1012	0,380	1275	0,120	1663	0,048	1690	0,035	1826
500	0,425	1695	0,214	2698	0,116	3372	0,039	2967	0,032	2933
510	0,173	3806	0,089	5060	0,045	5570	0,011	4312	0,005	4251
520	0,042	5333	0,019	6393	0,006	6273	-0,007	4852	-0,005	4746
530	0,032	5257	0,013	6318	0,003	6185	-0,009	4845	-0,007	4497
540	0,022	5514	0,004	6382	-0,001	6522	-0,016	4571	-0,011	4385
550	0,031	5948	0,004	6253	0,031	6477	-0,064	4646	0,049	4416
560	0	5076	0,04	5681	-0,077	5448	0,040	3907	0	3616
570	0	4194	0	4872	0	4434	0	3146	0	2954
580	-0,339	3568	-0,699	3846	-0,339	3670	-0,163	2757	0	2504
590	0,114	2985	0	3195	-0,032	3087	0	2334	-0,062	2126
600	-0,249	2623	-0,183	2809	-0,279	2775	0	2045	-0,296	1862



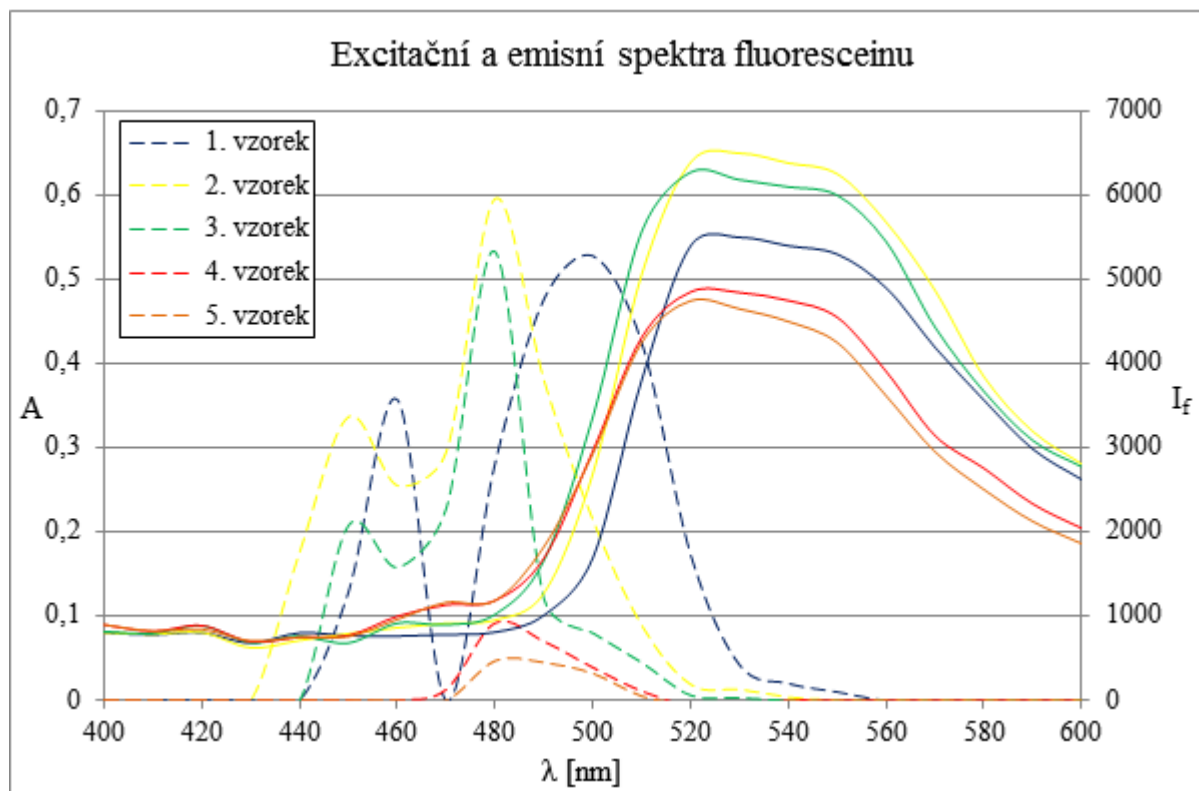
Obr. 7.16 Graf závislosti absorbance na vlnové délce. Hodnoty absorbance odečteny při $\lambda_{em}=514$ nm.



Obr. 7.17 Graf závislosti intenzity fluorescence na vlnové délce.



Obr. 7.18 Excitačně emisní spektra fluoresceinu v etanolu. Surová data. Čárkovanou čarou – excitační spektra, plnou čarou – emisní spektra.



Obr. 7.19 Excitačně emisní spektra fluoresceinu v etanolu. Upravená data.

Diskuze: Na obalu fluoresceinu lze vyčíst doporučené hodnoty, při kterých by intenzita fluorescence měla být maximální. Tyto hodnoty jsou $\lambda_{ex}=490$ nm a $\lambda_{em}=514$ nm. Při měření fluorescence byla proto použita vlnová délka excitovaného světla 490 nm. Na Obr. 7.12 je ale

patrné, že vlnová délka emitovaného světla neodpovídá hodnotě 514 nm, ale je posunuta k vyšším hodnotám vlnových délek, v našem případě 520,25 nm. Vysvětlením může být to, že jako rozpouštědlo byl použit 96% etanol, který obsahuje jednu dvojnou vazbu. Složitější látky, které obsahují jednu a více násobných vazeb, umožňují více energetických přechodů a tím i posun k vyšším vlnovým délkám.

Z připravených roztoků fluoresceinu o různé koncentraci byla naměřena absorpce při doporučené vlnové délce 514,09 nm, dále pak intenzita fluorescence při doporučené vlnové délce emitovaného světla 514,09 nm a z grafu určené maximální vlnové délce 520,25 nm. Hodnoty byly vyneseny do grafů. Obr. 7.14 zobrazuje závislost intenzity fluorescence na koncentraci fluoresceinu. Je zřejmé, že intenzita fluorescence měřená při doporučené hodnotě 514,09 nm je menší. Dále lze z grafu vyčíst, že s rostoucí koncentrací fluoresceinu narůstá intenzita fluorescence téměř lineárně (při zanedbání chyb měření) až do určitého bodu. Mezním bodem v experimentu je koncentrace 1,77 mmol/l. S rostoucí koncentrací barviva intenzita fluorescence klesá. Toto zhášení může být způsobeno neelastickými srážkami excitovaných molekul s molekulami v základním stavu, nebo také asociací molekul (tvorba dimerů z monomerů, dimery nefluoreskují).

Na Obr. 7.16 jsou zobrazeny excitační spektra. Čím vyšší koncentrace barviva, tím vyšší absorbance. Na Obr. 7.17 jsou v grafu zobrazeny emisní spektra fluoresceinu. Jak už bylo zmíněno, ideální vlnová délka emitovaného záření pro odečet intenzity fluorescence odpovídá hodnotě 520 nm. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací barviva roste intenzita fluorescence, a že od určité mezní koncentrace dochází k poklesu kvantového výtěžku fluorescence (1. vzorek). Obr. 7.18 sjednocuje surová data a vytváří excitačně emisní spektra. Pro lepší přehled jsou data upravena na Obr. 7.19.

8. ZÁVĚR

Cílem zadané bakalářské práce bylo seznámit se se školními spektrofotometry. Teoretická část se zabývá teorií k dané problematice. Pomocí spektrofotometrů se stanovují veličiny jako absorbance, transmittance, koncentrace, které slouží k určení vlastností látek. Některé měřené látky vykazují jev fluorescence nebo fosforescence. Bylo nutné pochopit tyto jevy a popsat vše, co s nimi souvisí a jak se dají měřit. Podrobnější popis technických parametrů spektrofotometrů, které byly použity k měření, je uveden v příloze B.

V praktické části bylo navrženo a na spektrofotometrech vyzkoušeno několik experimentů. V práci jsou uvedeny tři měření se základními zcela dostupnými látkami. V první úloze byla měřena koncentrace roztoku manganistanu draselného. Byla připravena série roztoků o známé koncentraci. U libovolně zvoleného roztoku bylo proměřeno absorpční spektrum a byla vybrána vlnová délka, při které roztok maximálně absorboval. Na určené vlnové délce byly pak proměřeny absorbance všech roztoků. Byla sestavena kalibrační křivka. Program SpectraSuite umožňuje měřit koncentrace látek třemi způsoby: použitím Lambert-Beerova zákona, sestavením kalibrační křivky a použitím dříve uložených kalibračních dat. Byly vyzkoušeny první dva způsoby a zjištěny koncentrace analyzovaných roztoků.

V druhém měření byla ověřena platnost Lambert-Beerova zákona, který platí pro velmi zředěné roztoky. Měření bylo provedeno s roztokem potravinářského barviva. Barvivo je směsí tří různých látek, proto nebylo možné určit přesnou molární koncentraci roztoků (k tomu je zapotřebí standardních roztoků každé látky). Pro každou látku byla odečtena absorbance odpovídající tabelové hodnotě vlnové délky, při níž látka maximálně absorbuje. Hodnoty absorbancí byly v poměru 0,8:1:1, proto při výpočtu molární koncentrace byl použit průměr hodnot molární hmotnosti odpovídající určenému poměru. Relativní hodnoty molární koncentrace byly použity pro sestavení kalibračního grafu, ze kterého lze vyčíst, že u koncentrací vyšších 0,01 mol/l přestává platit lineární závislost.

V třetí úloze byla měřena intenzita fluorescence. Použitým fluoroforem byl fluorescein. Byly namíchány roztoky o různých koncentracích a sestaven graf závislosti intenzity fluorescence na koncentraci fluoroforu. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací fluoroforu roste i intenzita fluorescence až do mezního bodu, kdy pak s rostoucí koncentrací fluoroforu klesá intenzita fluorescence. Zhášení může mít několik důvodů, nejčastěji je vysvětlováno srážkami excitovaných molekul s molekulami v základním stavu nebo asociací molekul. Další částí měření bylo u roztoků proměřit absorpční a fluorescenční spektrum a sestavit graf excitačního a emisního spektra.


Pro navržené úlohy byly vypracovány ukázkové protokoly s popisem postupu měření a podrobným návodem k obsluze SpectraSuite (součást přílohy).

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Wikiskripta [online]. *Spektrofotometrie*. Praha : MEFANET, 2009 [cit. 2011-01-08]. Dostupné z WWW: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Spektrofotometrie>>.
- [2] *Základy spektrofotometrie* [online]. [s.l.], 200?. 8 s. Praktické cvičení. Univerzita Karlova, Lékařská fakulta. Dostupné z WWW: <http://www.lfhk.cuni.cz/chemie/dokumenty/Praktika/zima/ZS06_spektrofotometrie_10.doc>
- [3] SINICA, Alla. *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra* [online]. [Praha], 200?. 12 s. Laboratorní cvičení. VŠCHT, Ústav analytické chemie. [PDF] Dostupné z WWW: <www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf>.
- [4] OPEKAR, František. *Optické metody* [online]. Praha, 200?. 10 s. Učební text. Univerzita Karlova, Katedra analytické chemie. Dostupné z WWW: <www.natur.cuni.cz/~opekar/analchem/anchem14a.doc>.
- [5] CHMELAR, Milan. *Lékařská laboratorní technika*. Vyd. 1. Brno : Vysoké učení technické v Brně, 2000. 119 s. ISBN 8021417706.
- [6] PREISLER, Jan. *Molekulová luminiscenční spektrometrie* [online]. [s.l.], 2009. 13 s. Učební text. Masarykova Univerzita. [PDF] Dostupné z WWW: <bart.chemi.muni.cz/courses/1a2.pdf>.
- [7] SKOUMALOVÁ, VYTÁŠEK, SRBOVÁ. *Fluorescence a chemiluminiscence* [online]. [s.l.], 200?. 19 s. Učební text. Univerzita Karlova, Ústav lékařské chemie a biochemie. [PDF] Dostupné z WWW: <www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/Fluorescence.ppt>.
- [8] Spectrophotometry. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, 2004, last modified on 2011 [cit. 2011-01-08]. Dostupné z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Spectrophotometry>>.
- [9] LAKOWICZ, Joseph. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Baltimore (Maryland) : University of Maryland School of Medicine, 2006. Introduction to Fluorescence, s. 923. ISBN 0-387-31278-1.
- [10] Fosforescence. In *Wikiskripta* [online]. Praha : MEFANET, 2010, stránka naposledy změněna 2010 [cit. 2011-01-09]. Dostupné z WWW: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fosforescence>>.
- [11] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. Praha : Univerzita Karlova, 200? [cit. 2011-01-09]. Principy fluorescenční spektroskopie. Dostupné z WWW: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>>.
- [12] *Laboratoř molekulové spektroskopie : VŠCHT Praha* [online]. 200? [cit. 2011-01-09]. Infračervená spektroskopie. Dostupné z WWW: <<http://lms.vscht.cz/Zverze/Infrared.htm>>.
- [13] VLAS, Tomáš. *Projekt alfa* [online]. 200? [cit. 2011-01-09]. Lambert - Beerův zákon. Dostupné z WWW: <<http://projektalfa.ic.cz/LB.htm>>.

- [14] Installation and Operation Manual : Experiment Tutorials. In *SpectraSuite Spectrometer Operating Software* [PDF]. Dunedin (Florida) : OceanOptics, 1999-2007. s. 168.
- [15] REICHL, Jaroslav. *Encyklopedie fyziky* [online]. c2010 [cit. 2011-01-09]. Záření absolutně černého tělesa. Dostupné z WWW: <<http://fyzika.jreichl.com/index.php?page=538&sekce=browse>>.
- [16] *Výukový portál : Fyzika* [online]. 200? [cit. 2011-01-09]. Záření absolutně černého tělesa. Dostupné z WWW: <http://www.gymhol.cz/projekt/fyzika/13_act/13_act.htm>.
- [17] *OceanOptics : Inventors of the world's first miniature spectrometer*. [online]. 2010 [cit. 2010-10-29]. USB650 Red Tide Spectrometer for Education. Dostupné z WWW: <<http://www.oceanoptics.com/Products/usb650.asp>>.
- [18] *OceanOptics : Inventors of the world's first miniature spectrometer*. [online]. 2010 [cit. 2010-11-09]. USB2000+ Miniature Fiber Optic Spectrometer. Dostupné z WWW: <<http://www.oceanoptics.com/Products/usb2000+.asp>>.
- [19] *OceanOptics: Inventors of the world's first miniature spectrometer*. [online]. 2010 [cit. 2010-11-10]. DH-2000 Deuterium Tungsten Halogen Light Sources. Dostupné z WWW: <<http://www.oceanoptics.com/Products/dh2000.asp>>.
- [20] LEE, Claudia. *Current protocols* [online]. 2009 [cit. 2011-01-09]. Fluorescence Spectroscopy. Dostupné z WWW: <<http://www.currentprotocols.com/protocol/et0204>>.
- [21] ŠTERN, Petr. *PEKO 2007* [online]. 2007, 2011 [cit. 2011-02-09]. Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii. Dostupné z WWW: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>>.
- [22] *Antonine Education Website* [online]. 200? [cit. 2010-10-15]. What are the uses and hazards of waves that form the Electromagnetic Spectrum?. Dostupné z WWW: <http://www.antonine-education.co.uk/physics_gcse/Unit_1/Topic_5/topic_5_what_are_the_uses_and_ha.htm>.
- [23] *Wikipedia* [online]. 2010 [cit. 2010-12-11]. Monochromator. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Monochromator#Czerny-Turner_monochromator>.
- [24] *Katedra analytické chemie - UP Olomouc* [online]. 2004 [cit. 2011-04-03]. Absorpční a luminiscenční spektrometrie v UV/Vis oblasti spektra. [PDF] Dostupné z WWW: <ach.upol.cz/user-files/intranet/im-uv-vis-1284990015.pdf>.
- [25] PAVLOVÁ, L. *Fyziologie rostlin : Energie, přeměna látek, sluneční záření* [online]. Praha : Karolinum, 2006. 9 s. Studijní text. Univerzita Karlova, Přírodovědná fakulta. [PDF] Dostupné z WWW: <kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/fyzrost/2_Energie.pdf>.
- [26] Požadavky na identitu a čistotu barviv. In *Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 54/2002 Sb., kterou se stanoví zdravotní požadavky na identitu a čistotu přídatných látek* [online]. Praha : Ministerstvo zdravotnictví, 2002 [cit. 2011-04-10]. Dostupné z WWW: <<http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/legislativa/zakon-o-potravinach/provade-ci-predpisy-mzd/100064867.html>>.

PŘÍLOHA A: PROTOKOLY PRO NAVRŽENÉ ÚLOHY

	Jméno:	Ročník/obor:	Měřeno dne:
	Teplota:	Tlak:	Vlhkost:
Název úlohy: STANOVENÍ MOLÁRNÍ KONCENTRACE ROZTOKŮ KMnO ₄			

Úkol:

Stanovte koncentraci neznámých roztoků manganistanu draselného z kalibračního grafu a výpočtem pomocí kalibračního faktoru. Vyhodnoťte naměřená data.


Potřeby k měření:

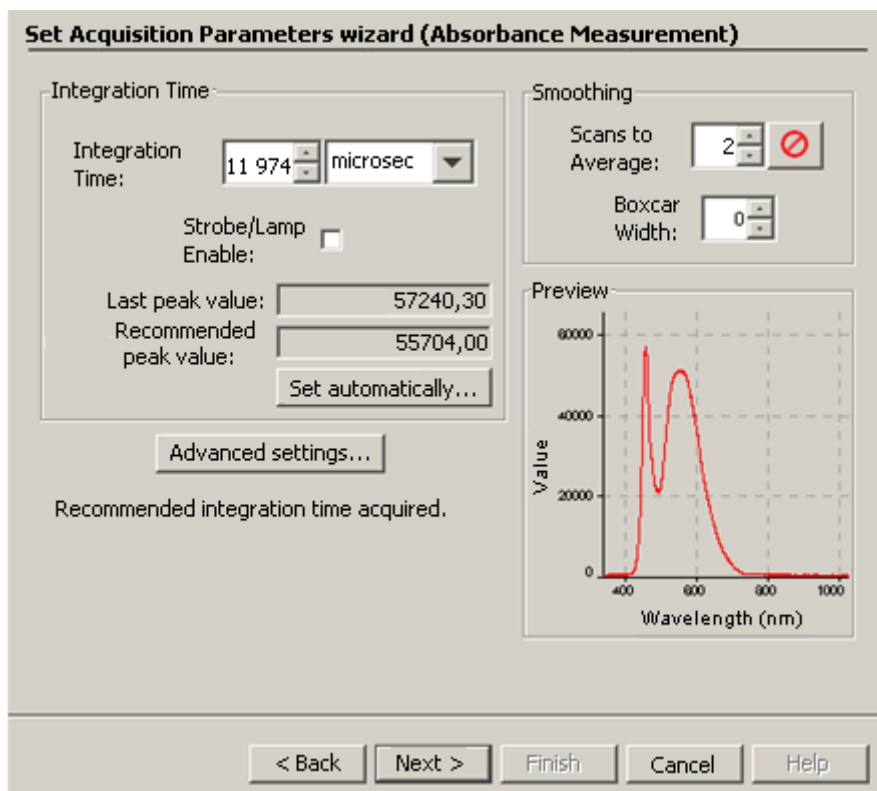
Manganistan draselný ($M_{\text{KMnO}_4} = 158,03 \text{ g/mol}$), destilovaná voda, pipety (2 ml), kyvety (1,5 ml; 12,5x12,5x45 mm), spektrofotometr USB2000+ (viz příloha B).

Pracovní postup:

- I. Připravte řadu kalibračních roztoků KMnO₄. Navažte 0,75 g manganistanu draselného a smíchejte s 20 ml destilované vody. Vypočítejte molární koncentraci zásobního roztoku. Připravte 6 kalibračních roztoků ředěním zásobního roztoku o koncentraci nižší 0,01 mol/l. Za referenční vzorek vezměte destilovanou vodu.
- II. Proměřte absorpční spektrum některého z roztoků a určete vlnovou délku, při níž dochází k maximální absorbanci. Absorbance pro různě koncentrované roztoky KMnO₄ měřte při této vlnové délce.
- III. Ze známých hodnot koncentrací a naměřených hodnot absorbancí sestavte kalibrační křivku (závislost absorbance na koncentraci).
- IV. Z kalibrační křivky po změření absorbance analyzovaného vzorku odečtěte jeho koncentraci. Určete molární absorpční koeficient (z Lambert-Beerova vztahu nebo z kalibrační křivky) a použijte jej pro výpočet koncentrace dle Lambert-Beerova vztahu.

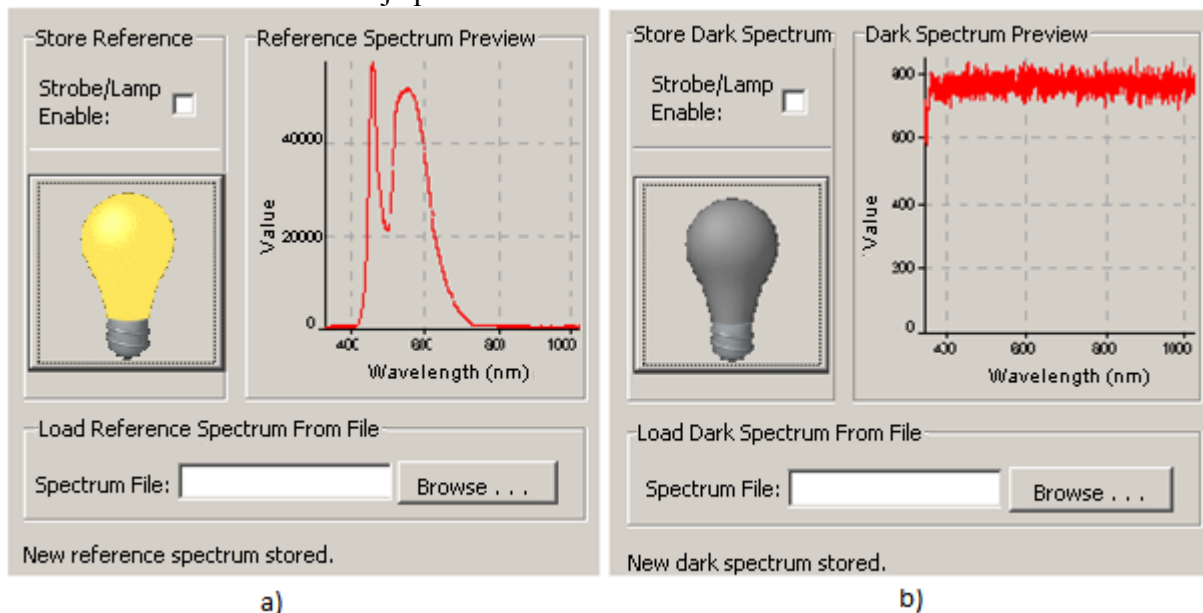
Návod k obsluze SpectraSuite:

Do spektrometru se vloží kyveta s referenčním vzorkem. Otevřením ikony SpectraSuite na ploše PC se zobrazí pracovní okno. K měření absorbance slouží ikona  nebo se měření spustí výběrem záložky *File* → *New* → *Absorbance Measurement*. Zobrazí se okno, ve kterém si uživatel vybere světelný zdroj a spektrometr. Kliknutím na *Next* se zobrazí okno pro nastavení parametrů (viz Obr. 1). Uživatel nastaví integrační čas (*Integration time*), který určuje, po jaké době se obnovují měřená data. Integrační čas lze nastavit zesílením/zeslabením zdroje světla nebo pomocí tlačítka *Set automatically*, které automaticky nastaví vyhovující integrační čas. *Recommended peak value* uvádí doporučenou hodnotu peaku. Záložka *Scans to Average* udává průměrování dat. *Boxcar width* nastavuje šířku vyhlazení signálu průměrováním datových bodů. S vyšší hodnotou dochází k vyhlazování signálu, ale ztrátě informací.



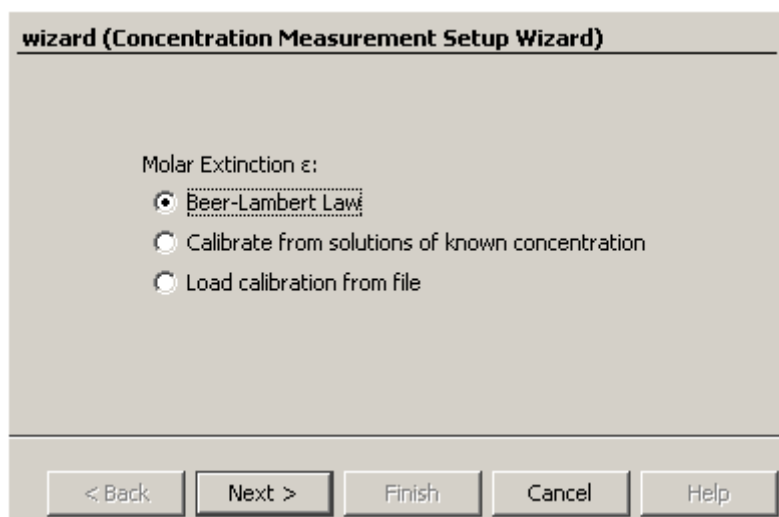
Obr. 1 Měření absorbance – nastavení akvizčních parametrů (použitý zdroj – bílé světlo).

Další záložka *Next* otevře okna zobrazená na Obr. 2. Kliknutím na žlutou žárovku se nastaví referenční spektrum. Pro nastavení tmavého spektra (spektrum pozadí) musí být vypnut zdroj světla. Spuštěním *Finish* a zapnutím zdroje světla se zobrazí graf absorpčního spektra referenčního vzorku. Následuje proměření vzorků.



Obr. 2 Průvodce spektry: a) referenční spektrum b) tmavé spektrum bílého světla.

Výběrem *File* → *New* → *Concentration Experiment* z menu se otevře okno pro měření koncentrace, které nabízí 3 způsoby měření koncentrace (použití Lambert-Beerova zákona, kalibrace z roztoků o známé koncentraci, načtení dříve uložených kalibračních dat ze souboru).



Obr. 3 Měření koncentrace.

1. *Použití Lambert – Beerova zákona (Beer-Lambert Law)* - v roztoku musí být jen jedna absorbující složka. Pokud je v roztoku přítomno více složek, je absorbance sumou absorbancí jednotlivých složek. Kliknutím na *Next* se otevře následující okno:

Obr. 4 Nastavení měření koncentrace KMnO_4 .

Uživatel musí vyplnit políčka dle konstant vhodné pro použitý vzorek. Pojmenování (*Compound Name*) a jednotky koncentrace (*Concentration Units*) lze nastavit libovolně. *Wavelength* je vlnová délka při maximální absorbanci. *Path length* je délka kyvety. Hodnota molárního absorpčního koeficientu (*Molar Extinction*) je tabelovaná pro každou látku nebo ji lze spočítat z Lambert-Beerova vztahu.

2. *Kalibrace z roztoku o známé koncentraci (Calibrate from solutions of known concentrations)* - do spektrometru se vloží vzorek, u něhož je známá koncentrace. Přístroj se kalibruje na základě známých koncentrací vzorků a výpočtem se získá koncentrace neznámých vzorků. Program umožňuje vybrat jedinou vlnovou délku, kde je absorbance vzorku největší (*One Wavelength*). Umožňuje také průměrovat (*Average from to*) nebo integrovat (*Integrate over to*) na celém rozsahu vlnových délek.

wizard (Concentration Measurement Setup Wizard)

Range Selection

☒ One Wavelength: 555,11 nm

☐ Average from 337,56 nm to 337,56 nm

☐ Integrate over 337,56 nm to 337,56 nm

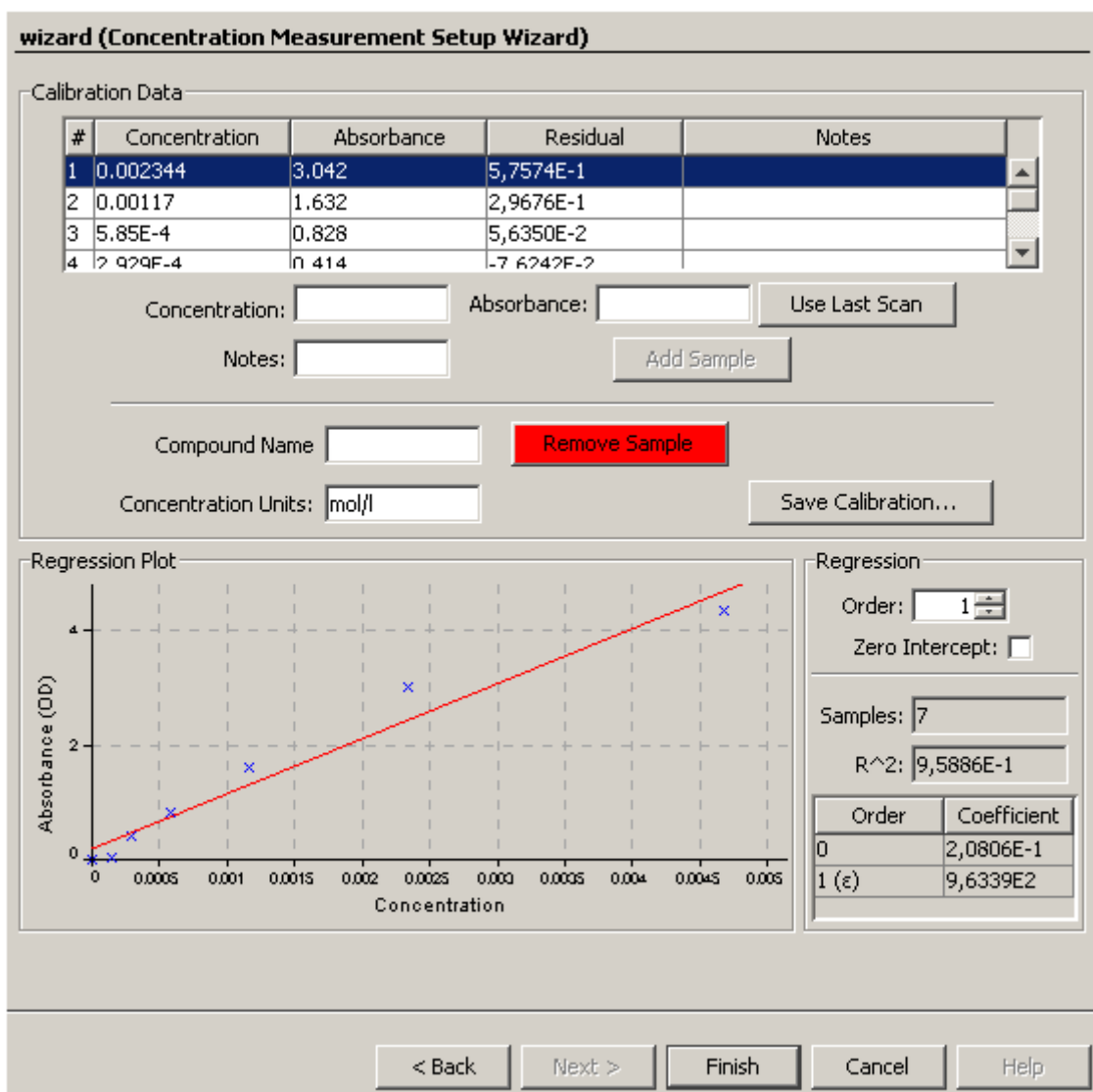
Method: Rectangular

< Back Next > Finish Cancel Help

Obr. 5 Nastavení měření koncentrace.

Kliknutím na tlačítko *Next* se objeví okno zobrazené na Obr. 6.


- *Compound Name* – pole pro vyplnění názvu měřené látky.
- *Concentration Units* – pole pro vyplnění jednotky koncentrace.
- *Concentration* – pole pro doplnění hodnoty známé koncentrace.
- *Absorbance* – pole pro doplnění odpovídající hodnoty maximální absorbance.
- *Use Last Scan* – po umístění odpovídající kyvety do držáku se přímo proměří absorbance.
- *Add Sample* – zaznamenají se data koncentrace a absorbance. Tento krok se projeví v grafu a tabulce.
- *Regression Plot* – graf v dolní části okna. Po zadání několika bodů se vytvoří regresní přímka. Obecně platí, že více dat poskytuje lepší odhad koncentrace neznámého vzorku.
- *Order* umožňuje nastavit regresi na 1 (první řád polynomu), nebo 2 (druhý řád polynomu).
- *Zero Intercept* – zaškrtnutím políčka bude regresní přímka procházet nulou (tj. nulová koncentrace a absorbance).
- *R²* – zobrazuje kvalitu regrese. Udává hodnotu, kde 1,0 je perfektní (nižší čísla indikují nízký výkon).
- *Residual* – uvádí reziduální hodnotu (chybu) pro každý bod. Udává rozdíl mezi známou koncentrací vzorku a odhadovanou koncentrací pomocí regrese. V ideálním případě se tato hodnota blíží nule.
- *Remove Sample* – pro odstranění vzorku z tabulky v horní části okna.
- *Finish* – po zadání dostatečného množství bodů a vytvoření regresní přímky se mohou měřit koncentrace různých roztoků.



Obr. 6 Kalibrační data, kalibrační křivka.

KMnO₄ Concentration:

Provedení samotného měření umožňuje tlačítko *Single Update* (např. po každém vložení kyvety s neznámou koncentrací). Kliknutím na *Continuous Update* se hodnota měřené koncentrace průběžně aktualizuje. Jsou zobrazeny název roztoku a jednotky koncentrace poskytnuté na začátku měření. Pokud se číselná hodnota pro koncentraci objeví v černé, výpočet koncentrace byl v mezích nastavení. Je-li vzorek mimo rozsah, číselná hodnota pro koncentraci se objeví v červené, což znamená, že hodnota koncentrace nemusí být přesná. *Measurement Setup* umožňuje návrat do menu, znovu otevřít průvodce a změnit parametry pro měření koncentrace.

	Jméno:	Ročník/obor:	Měřeno dne:
	Teplota:	Tlak:	Vlhkost:
Název úlohy: OVĚŘENÍ PLATNOSTI LAMBERT-BEEROVA ZÁKONA			

Úkol:

Ověřte platnost Lambert-Beerova zákona pro různě koncentrované roztoky. Vyhodnoťte naměřená data.


Potřeby k měření:

Potravinářské barvivo červeň jahodová (výrobce AROCO, spol.s.r.o), destilovaná voda, pipeta (2 ml), stříkačka (10 ml), Erlenmeyerova širokohrdlá baňka (25 ml), kádinka (50 ml), kyvety (1,5 ml; 12,5x12,5x45 mm), analytické váhy, spektrofotometr USB650.

Složení barviva: E 122 Azorubin ($M = 502,44 \text{ g/mol}$, A_{\max} při 516 nm), E 102 Tartrazin ($M = 534,37 \text{ g/mol}$, A_{\max} při 426 nm), E 110 Oranžová žlut' ($M = 452,37 \text{ g/mol}$, A_{\max} při 485 nm).

Pracovní postup:

- I. Navažte 500 mg barviva a toto množství rozpust'te v 5 ml destilované vody. Ředěním připravte 10 kalibračních roztoků.
- II. Změřte absorbanci odpovídající tabelové hodnotě vlnové délky každé látky, která je obsažena v barvivu. Vypočt'ete látkovou koncentraci. Sestrojte graf závislosti absorbance na koncentraci. Zdůvodněte, proč pro platnost Lambert-Beerova zákona je nutné použít roztoky o koncentraci nižší 0,01 mol/l.

	Jméno:	Ročník/obor:	Měřeno dne:
	Teplota:	Tlak:	Vlhkost:
Název úlohy: MĚŘENÍ FLUORESCENCE			

Úkol:

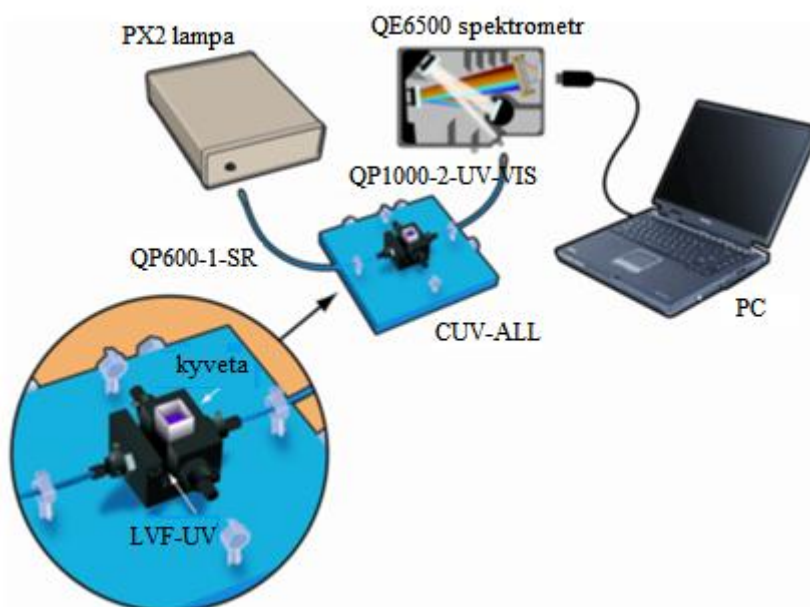
Proměřte excitačně emisní spektra fluoresceinu o různých koncentracích. Vyhodnoťte naměřená data.

Potřeby k měření:

Fluorescein (firma Fluka Analytical, $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$, $M = 332,31 \text{ g/mol}$), ethylalkohol (96%), pipety (2 ml), stříkačka (10 ml), Erlenmeyerova širokohrdlá baňka (25 ml), kyvety (1,5 ml; 12,5x12,5x45 mm), analytické váhy, magnetická míchačka, spektrofotometr USB2000+, USB650 RedTide (viz příloha B).

Pracovní postup:

- I. Na analytických vahách navažte 25 mg fluoresceinu. Toto množství rozpustíte v 20 ml etanolu. Pro důkladné rozpuštění fluoresceinu ponechte roztok 30 min míchat na magnetické míchačce. Přepравte ředěním 5 roztoků a vypočtete jejich molární koncentraci.
- II. Sestavte měřící pracoviště. Spektrometry zapojte dle Obr. 7. Spektrometr, který detekuje fluorescenci, musí být v úhlu 90° .



Obr. 7 Měřící pracoviště pro měření fluorescence.

- III. Měření fluorescence spustíte pomocí *File* → *New* → *New Gated Fluorescence Measurement*. Postup je podobný jako u měření koncentrace (je nutné vybrat zdroj, nastavit integrační čas, referenční spektrum, tmavé spektrum).

- IV. Nastavte excitační vlnovou délku na doporučenou hodnotu ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$). Určete maximální emisní vlnovou délku fluoresceinu. Proměřte intenzitu fluorescence všech roztoků na doporučené emisní vlnové délce ($\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$) a určené v předchozím kroku. Vyneste v grafu závislost intenzity fluorescence na koncentraci.
- V. Proměřte absorbance roztoků při $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$. Vyneste do jednoho grafu závislost absorbance na vlnové délce (excitační spektrum) a závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (emisní spektrum).

PŘÍLOHA B: LABORATORNÍ SPEKTROFOTOMETRY

1. USB650 Red Tide

Spektrometr Red Tide je laboratorní spektrometr. Red Tide je předem nastavený, standardní spektrometr, který může být doplněn různým příslušenstvím pro vytvoření aplikačně-specifických systémů pro měření absorpance, reflexe a emisní aplikace. Red Tide má rozsah vlnových délek 350-1000 nm a detektor využívá 650 pixelů (650 datových bodů v jednom plném spektru). Red Tide nabízí spektrální rozlišení (FWHM)~ 2,0 nm.

USB-650-VIS-NIR je propojen s přímým zdrojem světla. Světelný zdroj obsahuje LED posílený wolframovým zdrojem. V této konfiguraci má rozsah vlnových délek 370 - 980 nm. USB-650-UV-VIS obsahuje deuteriový wolframovo-halogenový zdroj světla. V této konfiguraci má systém rozsah vlnových délek 200 - 850 nm. [17]



Obr. 1 USB-650-VIS-NIR. [17]

Technická data

Fyzické vlastnosti	
Rozměry (v mm):	89,1 x 63,3 x 34,4
Hmotnost:	190 g
Detektor	
Typ:	Lineární CCD křemíkové pole
Počet pixelů:	650 px
Velikost pixelu:	14 μm x 200 μm
Pixelová hloubka:	~ 62.500 elektronů
Citlivost:	75 fotonů / při 400 nm
Optické zařízení	
Design:	f/4, asymetrické, Czerny-Turner
Ohnisková vzdálenost:	42 mm vstup, 68 mm výstup
Vstupní clony:	25 μm široké štěrby
Optický konektor:	SMA 905
Spektroskopické vlastnosti	
Rozsah vlnových délek: USB-650 USB-650-VIS-NIR USB-650-UV-VIS	350-1000 nm
Spektrální rozlišení:	~ 2,0 nm FWHM
Signál / šum:	250:1 (na plný signál)
A / D rozlišení:	12 bit
Dynamický rozsah:	2 x 10 ⁸ , 1300:1 pro jednu akvizici
Integrační čas:	3 ms až 65 s (typické max 15 s)
Rozptýlené světlo:	<0,05% při 600 nm, <0,10% při 435 nm

Zkorigovaná linearita:	> 99,8 %
PC	
Operační systémy:	Windows 98/2000/XP, Mac OS X a Linux w / USB port
Operační software:	SpectraSuite spektroskopie

Cena

Položka	Popis	Cena
USB-650	Red Tide spektrometr	1154 \$
USB-650-VIS-NIR	Red Tide s integrovaným systémem odběru vzorků (wolframový zdroj světla)	1732 \$
USB-650-UV-VIS	Red Tide s integrovaným systémem odběru vzorků (deuteriový wolframovo-halogenový zdroj světla)	2887 \$
PS-2636	PascoXplorer GLX ruční datalogger a licenční klíč	Neuvedeno
USB-ISS-VIS	Integrovaný systém odběru vzorků pro kyvety (wolframový zdroj světla a držák na kyvetu Combo)	577 \$
SPECTRASUITE	Operační systém	199 \$
SPECTRASUITE-E	Licence umožňující až 40 kopií pro vzdělávací instituce	2499 \$

2. USB 2000+

Spektrometry USB2000+ pokrývají oblast UV-VIS-NIR (200 - 1100 nm) se spektrálním rozlišením až 0,3 nm. Přitom mohou změřit a zpracovat až 1000 spekter za sekundu. Tyto spektrometry vynikají univerzálností a jsou určeny pro všeobecné laboratorní použití.

USB2000+ využívá 2 MHz A/D převodník, který umožňuje každou milisekundu zachytit a uložit jedno celé spektrum do paměti (1000 plného spektra / sekundu). Kalibrační koeficienty vlnových délek jedinečné pro každý spektrometr jsou naprogramovány do čipu paměti. Software čte tyto hodnoty ze spektrometru. USB2000+ nevyžaduje žádné externí napájení, je napájen z PC. USB2000+ nabízí vysoký výkon detektoru lineárního CCD pole s 2048 prvky a optickým zařízením. USB2000 + může být doplněn různým příslušenstvím, jako jsou světelné zdroje, držáky pro odběr vzorků, držáky filtrů, průtokové komůrky, optické sondy a čidla, kolimační čočky, tlumiče, normy difuzního odrazu, kulový integrátor, optická vlákna. [18]

Technická data

Fyzické vlastnosti	
Rozměry (v mm):	89,1 x 63,3 x 34,4
Hmotnost:	190 g
Detektor	
Typ:	Sony ILX511B lineární CCD křemíkové pole
Rozsah detektoru:	200 – 1100 nm
Počet pixelů:	2048 px
Velikost pixelu:	14 μm x 200 μm
Pixelová hloubka:	~ 62.500 elektronů
Citlivost:	75 fotonů / při 400 nm, 41 fotonů / 600 nm
Optické zařízení	
Design:	f/4, symetrické, Czerny-Turner
Ohnisková vzdálenost:	42 mm vstup, 68 mm výstup

Vstupní clony:	5, 10, 25, 50, 100 nebo 200 μm široké štěrby nebo vlákno (bez štěrby)
Možnosti mřížky:	14 různých mřížek, UV prostřednictvím krátkovlnné NIR ⁶
HC-1 mřížka:	Ne
Soubor objektivu:	Ano, L2
OFLV možnosti filtrování:	OFLV od 200 do 850; OFLV od 350 do 1000
Ostatní filtry s možností filtrování:	Dlouhá propust OF-1 filtr
Kolimační a fokusovaná zrcadla:	Standardní nebo SAG+
UV rozšířené okno:	Ano, UV2
Optický konektor:	SMA 905 - 0,22 numerická apertura jednoprvkového optického vlákna
Spektroskopické vlastnosti	
Rozsah vlnových délek:	Závislost na mřížce
Spektrální rozlišení:	$\sim 0,3 - 10\text{nm FWHM}$
Signál / šum:	250:1 (na plný signál)
A / D rozlišení:	16 bit
Tmavý šum:	50 RMS
Dynamický rozsah:	2×10^8 , 1300:1 pro jednu akvizici
Integrační čas:	1 ms až 30 s
Rozptýlené světlo:	$< 0,05\%$ při 600 nm, $< 0,10\%$ při 435 nm
Zkorigovaná linearita:	$> 99,8\%$
Elektronika	
Spotřeba elektrické energie:	250 mA na 5 VDC
Rychlost přenosu dat:	Plný skenuje do paměti každou 1 ms s USB 2.0 nebo 1.1 port, 300 ms se sériovým portem
Vstupy / výstupy:	Ne
Analogové kanály:	Ne
Auto-nulování:	Ne
Výpadek kompatibility:	Ne
Spouštěcí módy:	3 režimy
Vzorkování (snímací impulz):	Ano
Zpoždění:	Ano
Konektor:	22- pinový konektor
PC	
Operační systémy:	Windows 98/2000/XP, Mac OS X a Linux s USB portem, každý 32-bitový OS Windows se sériovým portem
PC rozhraní:	USB 2.0, RS-232 (2-drátový) na 57,6 K baudů
Periferní rozhraní:	I2C integrovaný obvod

Cena

Položka	Popis	Cena
USB2000+	USB2000+ uživatelsky nakonfigurovaný spektrometr. USB2000+ detektor a USB2000+ optické zařízení	2639 \$
SPECTRASUITE	SpectraSuite spektroskopie Operační systém	199 \$

⁶NIR (near infrared) – blízké infračervené záření, vlnová délka 760–1400 nm

3. DH-2000

DH-2000 deuterium wolframovo-halogenový zdroj světla je zdroj světla, který obsahuje deuteriový a wolframovo-halogenový světelný zdroj v jedné optické dráze. Kombinované spektrum světelného zdroje vytváří silný, stabilní výstup se spektrem od 215 až do 2000 nm. Kromě toho, přítomný DUV⁷ světelný zdroj poskytuje vlnovou délku 190-1700 nm.



Obr. 2 DH-2000. [19]

DH-2000 má příslušenství pro optické vlákno a bezpečnostní clony, které chrání před světlem, pokud není vlákno připojeno. DH-2000 má potenciometr na zadní straně světelného zdroje k vyvážení intenzity světla mezi deuteriovým a wolframovým halogenovým zdrojem světla. Tento potenciometr umožňuje nastavit optický výkon wolframového halogenového světla z 10 až na 100 %. [19]

Technická data

Rozměry (v mm):	150 x 135 x 319
Hmotnost:	3,5 kg
Spotřeba elektrické energie:	25 W (deuterium), 20 W (wolframový halogen)
Rozsah vlnových délek:	190 - 400 nm (DUV deuteriová žárovka) 215-2000 nm (standardní deuteriové a wolframovo-halogenové žárovky)
Vlhkost:	5-95 % bez kondenzace při 40 ° C
Proud:	Provozní 85 V/0,3A
Životnost:	1000 hodin
Napětí:	Zapalování 580 W při 20 °C
Drift proudového napětí:	<0,01% za hodinu
Stabilita proudového napětí:	<5x10 ⁻⁶ peak k peaku (0,1 až 10,0 Hz)
Provozní teplota:	5 °C - 35 °C
Požadavky na napájení:	85-264 V 50/60 Hz
Charakteristické záření:	Otvor 0,5 mm, numerická apertura 26° (13°), fokusevané, celková energie 100 W
Spotřeba elektrické energie:	Přibližně 78 J
Zahřívací čas:	40 minut (deuterium); 20 minut (wolframový halogen)
Značení:	CE, VDI / VDE 0160, EN 61010

Cena

Položka	Popis	Cena
DH-2000	Poskytuje deuteriový a wolframovo-halogenový světelný zdroj v jedné optické dráze, stálý výstup 210-1700 nm, nastavitelný wolframovo halogenový výkon.	3102\$

⁷Deepultraviolet (DUV) – hluboké ultrafialové záření.

DH-2000-DUV	Identický s DH2000, kromě toho používá DUV deuteriovou žárovku poskytující rozsah vlnových délek 170 – 1700 nm.	3433\$
DH-2000-S	Identický s DH2000, kromě toho je dodáván se clonou (řízené pomocí signálu TTL)	3601\$
DH-2000-FHS	Identický s DH2000, kromě toho je dodáván s držákem na filtry (25 mm čtvercové, 25 mm kulaté).	3931\$
DH-2000-BH	Náhradní wolframovo-halogenové žárovky	186 \$
DH-2000-BD	Náhradní deuteriové žárovky pro DH2000	768 \$